

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES PROTÉINES DE BLÉ D'HIVER :  
NOUVEAUX AGENTS CRYOPROTECTEURS  
POUR LES HÉPATOCYTES DE RAT

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

MÉLANIE GRONDIN

JUILLET 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*«Si la cause est bonne, c'est de la persévérance.  
Si la cause est mauvaise, c'est de l'obstination.»*

*Laurence STERNE*

## IN MEMORIAM

Chercheuse de renom en biochimie et en toxicologie, la professeure Francine Beaudoin-Denizeau a gagné le respect de ses collègues et étudiants. Elle était une vraie professeure au sens noble du terme. Après une longue maladie, qu'elle a combattue avec une dignité et un courage de tous les instants, elle nous a quittés. Mais, aussi longtemps que les mots auront une mémoire, tous nous nous souviendrons d'elle.

En tant qu'étudiante j'ai bénéficié de son expertise et de ces précieux conseils scientifiques au fil des ans. Francine tenait à cœur le bien-être et la réussite de ses étudiants. D'ailleurs, je crois que ce qui a le plus attisé ma passion pour la recherche, c'est d'avoir travaillé avec quelqu'un d'aussi enthousiaste que Francine Denizeau. Elle a su me motiver et me communiquer son engouement pour la recherche. Elle prenait le temps de discuter avec ses étudiants, de nous amener à nous poser les bonnes questions et à explorer les possibilités qui s'offraient à nous.

Ainsi, toujours poussée vers de nouveaux rivages, à l'affût de nouveauté, Francine Denizeau optait souvent pour des projets innovateurs. Grâce à son sens de l'innovation, j'ai pu participer à deux projets novateurs intégrant plusieurs domaines de la biochimie, de la toxicologie à la biologie moléculaire en passant par la biologie végétale.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....</b>	<b>xvi</b>
 <b>CHAPITRE I .....</b>	 <b>1</b>
<b>PROBLÉMATIQUE.....</b>	<b>1</b>
 <b>CHAPITRE II .....</b>	 <b>7</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>7</b>
 2.1	LE FOIE ..... 8
2.1.1	LES CELLULES PARENCHYMATEUSES ..... 10
2.1.2	LES CELLULES NON PARENCHYMATEUSES ..... 12
2.2	LES DIFFÉRENTS RÔLES DU FOIE..... 13
2.3	LE MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES AU NIVEAU DU FOIE ..... 16
2.3.1	LE CYTOCHROME P450..... 19
2.4	LES SYSTÈMES <i>IN VITRO</i> POUR LES ÉTUDES DE FONCTIONNALITÉ DU FOIE ..... 23
2.4.1	SUSPENSIONS D'HÉPATOCYTES..... 26

2.4.2	CULTURES PRIMAIRES D'HÉPATOCYTES .....	27
2.5	LA CRYOCONSERVATION .....	30
2.5.1	LES PRINCIPES DE LA CRYOCONSERVATION.....	30
2.5.2	LES DOMMAGES LIÉS À LA CRYOCONSERVATION .....	33
2.5.3	MOYEN PHYSIQUE DE PROTECTION (CONTRÔLE DES CINÉTIQUES DE REFROIDISSEMENT) .....	37
2.5.4	LES MOYENS CHIMIQUES DE PROTECTION : LES CRYOPROTECTEURS.....	39
 <b>CHAPITRE III .....</b>		<b>53</b>
<b>PRÉSENTATION DE LA MÉTHODOLOGIE EN REGARD DES OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>		<b>53</b>
3.1	PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE BLÉ .....	54
3.1.1	MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITIONS DE CROISSANCE..	54
3.1.2	EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES .....	54
3.1.3	PURIFICATION DE L'EXTRAIT DE BLÉ.....	55
3.1.4	PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES .....	56
3.2	PRÉPARATION DES CELLULES D'HÉPATOCYTES DE RAT .....	56
3.2.1	ISOLATION ET CULTURE DES HÉPATOCYTES .....	56

3.2.2	CRYOCONSERVATION DES HÉPATOCYTES ET LIGNÉES CELLULAIRES .....	57
3.2.3	DÉCONGÉLATION DES CELLULES .....	58
3.2.4	TEST DE VIABILITÉ .....	59
3.2.4.1	TEST DE VIABILITÉ LIVE-DEAD.....	59
3.2.4.2	TEST DE LA LACTATE DÉHYDROGÉNASE (LDH).....	59
3.2.4.3	EFFICACITÉ D'ADHÉSION .....	59
3.2.4.4	ADHÉSION ET MORPHOLOGIE CELLULAIRE.....	60
3.2.4.5	IMMUNOFLUORESCENCE DES MOLÉCULES D'ADHÉSION .....	60
3.2.4.6	EXPRESSION PROTÉIQUE DES MOLÉCULES D'ADHÉSION .....	61
3.3	DÉTERMINATION DES FONCTIONS HÉPATOSPÉCIFIQUES .....	62
3.3.1	SÉCRÉTION D'ALBUMINE .....	62
3.3.2	DÉTERMINATION DU MÉTABOLISME DE L'URÉE .....	62
3.3.3	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450.....	63
3.3.4	EXPRESSION DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450....	64

## **CHAPITRE IV ..... 65**

### **WHEAT EXTRACTS AS AN EFFICIENT CRYOPROTECTIVE AGENT FOR PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES ..... 65**

4.1	RÉSUMÉ.....	68
4.2	ABSTRACT .....	69
4.3	INTRODUCTION.....	70
4.4	MATERIALS AND METHODS.....	74
4.5	RESULTS .....	80
4.6	DISCUSSION .....	85
4.7	LEGENDS.....	91
4.8	FIGURES .....	94

## **CHAPITRE V ..... 99**

### **WHEAT EXTRACTS AS AN EFFICIENT CRYOPROTECTIVE AGENT FOR PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES ..... 99**

5.1	RÉSUMÉ .....	102
5.2	ABSTRACT .....	103
5.3	INTRODUCTION .....	104
5.4	METHODS .....	107
5.5	RESULTS .....	111



5.6	DISCUSSION .....	116
5.7	LEGENDS TO FIGURES.....	121
5.8	FIGURES .....	124

## **CHAPITRE VI ..... 130**

### **WHEAT PROTEINS ENHANCE STABILITY AND FUNCTION OF ADHESION MOLECULES IN CRYOPRESERVED HEPATOCYTES ..... 130**

6.1	RÉSUMÉ.....	133
6.2	ABSTRACT .....	134
6.3	INTRODUCTION.....	135
6.3	MATERIALS AND METHODS.....	138
6.5	RESULTS AND DISCUSSION .....	144
6.6	FIGURE LEGENDS .....	152
6.7	FIGURES .....	154

## **CHAPITRE VII..... 157**

### **WHEAT PROTEINS IMPROVE CRYOPRESERVATION OF RAT HEPATOCYTES ..... 157**

7.1	RÉSUMÉ.....	160
7.2	ABSTRACT .....	161

7.3	INTRODUCTION.....	162
7.4	MATERIALS AND METHODS.....	164
7.5	RESULTS AND DISCUSSION .....	170
7.6	FIGURES IEGENDS .....	181
7.7	FIGURES .....	183
7.8	SUPPLEMENTAL DATA LEGENDS .....	187
7.9	FIGURES SUPPLEMENTAL DATA.....	190
 <b>CHAPITRE VIII .....</b>		<b>195</b>
<b>LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX CRYOPROTECTEURS .....</b>		<b>195</b>
 <b>CHAPITRE IX .....</b>		<b>206</b>
<b>LES EFFETS DE LA CRYOCONSERVATION SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450 CHEZ LES HÉPATOCYTES.....</b>		<b>206</b>
 <b>CHAPITRE X .....</b>		<b>214</b>
<b>LES EFFETS DE LA CRYOCONSERVATION SUR LES MOLÉCULES D'ADHÉSION DES HÉPATOCYTES .....</b>		<b>214</b>
 <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>224</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>		<b>229</b>

## **LISTE DES FIGURES**

### **CHAPITRE II**

Figure 2.1	Dessin anatomique du foie : vue de la face supérieure.....	8
Figure 2.2	Schéma d'une coupe anatomique du foie et représentation du réseau sanguin alimentant le foie. ....	9
Figure 2.3	Acinus hépatique .....	10
Figure 2.4	Représentation de la division de l'acinus .....	11
Figure 2.5	Illustration de l'effet solution .....	36
Figure 2.6	Graphique démontrant le pic de surfusion.....	38
Figure 2.7	Structure 3D des AFPs .....	43
Figure 2.8	Schéma de la réponse au stress du froid chez les plantes .....	45

### **CHAPITRE III**

Figure 1	Cryopreservation potential of WPEs on isolated rat hepatocytes and other cell types. ....	94
----------	---	----

Figure 2	Viability of cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.....	95
Figure 3	Analysis of adherence and cellular morphology of cryopreserved hepatocytes.....	96
Figure 4	Albumin secretion and detoxification of ammonium to urea by cryopreserved hepatocytes: beneficial effect of WPEs.....	97
Figure 5	Activity and expression of cytochrome P450 isoenzymes in cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.....	98

#### CHAPITRE IV

Figure 1	Cellular morphology of rat hepatocytes cryopreserved with WPE ..	124
Figure 2	Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in rat hepatocytes cryopreserved with WPE: comparison with DMSO-cryopreserved and fresh cells.....	125
Figure 3	Effect of cryopreservation of rat hepatocytes with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP3A1/2 .....	126
Figure 4	Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2D2 in hepatocytes cryopreserved with WPE.....	127
Figure 5	Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP1A1/2 in cryopreserved rat hepatocytes: effects of WPE .....	128

Figure 6	Effects of cryopreservation with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2C6.....	129
----------	---	-----

## CHAPITRE V

Figure 1	Dot plot for analysis of PI fluorescence by flow cytometry .....	154
Figure 2	Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on cellular morphology of cryopreserved hepatocytes .....	155
Figure 3	Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on protein expression of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes.....	156

## CHAPITRE VI

Figure 1	Cryopreservation potential of AcWPE and SulWPE in isolated rat hepatocytes.....	183
Figure 2	Cryopreservation potential of individual wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes. ....	184
Figure 3	Cryopreservation potential of combinations of wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes. ....	185

Figure 4	Cellular morphology of cryopreserved hepatocytes. ....	186
Figure S1	Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins. ....	190
Figure S2	Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 3A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins. ....	191
Figure S3	Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 2D2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins. ....	192
Figure S4	Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 1A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins. ....	193
Figure S5	Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 2C9 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins. ....	194

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **CHAPITRE II**

Tableau 2.1	Fonctions métaboliques des hépatocytes selon la localisation dans le foie .....	16
Tableau 2.2	Les enzymes de biotransformation du foie .....	18
Tableau 2.3	Principales familles de cytochromes P450 induites par les xénobiotiques chez le rat.....	22
Tableau 2.4	Comparaison des systèmes in vitro pour les études sur les fonctions hépatiques.....	24

### **CHAPITRE IV**

Table I.	Plating efficiency of thawed rat hepatocytes following cryopreservation with WPEs compared to an optimized DMSO standard.....	90
----------	---	----

## CHAPITRE VI

Table 1	Viability and Attachment Efficiency of Rat Hepatocytes following Cryopreservation with WPs, Purified WPs and Recombinant Wheat Proteins.....	151
---------	--	-----

## CHAPITRE VII

Table I	Attachment efficiency of rat hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins.....	178
Table II	Activities of cytochrome P450 isoforms in suspensions of hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins. ....	179
Table III	Rates of induction of activities of cytochrome P450 isoforms in monolayer cultures of hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins.....	180



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

3-MC	3-méthylcholanthrene
A549	Carcinome pulmonaire humain
AcWPE	Extrait de protéines de blé, partiellement purifié avec l'acétone
AFGP	Anti-freeze glycoprotein ou glycoprotéine antigel
AFP	Anti-freeze protein ou protéine antigel
AJ	Jonction adhérente
AMMC	3-[2-(N,N-diéthyl-N-méthylammonium)éthyle]-7-méthoxy-4-méthylcoumarine
APX	Ascorbate peroxydase
ATP	Adénosine triphosphate
BPC	Biphényles polychlorés
BSA	Albumine de sérum bovin
CA	« Cold acclimated » ou acclimaté au froid
Caco-2	Adénocarcinome colorectal humain
CEC	3-Cyano-7-éthoxycoumarine
CHO-B1	Cellule de cancer d'ovaire de hamster chinois transfecté avec l'ADN TGF- $\beta$ 1
CP	« Cryopreserved cells » ou cellules cryoconservées
CYP	Cytochrome P450
DFB	3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-diméthyl-4-[4-(méthylsulfonyl)phényl]furan-2(5 <i>H</i> )-one
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol N,N-tétraacétique
EROD	Éthoxyrésorufine-O-dééthylase

FBS ou FVS	Sérum de veau fœtal
FT	« Freezing tolerance » ou tolérance au gel
FTP	« Freezing tolerance proteins » ou Protéines de tolérance au gel
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion transférase
HeLa	Cellule de cancer du col de l'utérus de <b>Henrietta Lacks</b>
HIEC	Cellules d'épithélium intestinal humain
IIF	Formation de glace intracellulaire
IPTG	Isopropyl $\beta$ -1-thiogalactopyranoside
IRI	« Inhibition of ice recrystallization » ou inhibition de la recristallisation de la glace
IRIP	« Ice Recrystallisation Inhibition Protein » ou protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace
Jurkat	cellule leucémique humaine T
L-15	Milieu Leibovitz
LDH	Lactate déshydrogénase
LEA-3	« Late embryogenesis abundant protein, group 3 » ou Protéine abondante d'embryogenèse tardives
MFC	7-méthoxy-4-(trifluoro-méthyle)coumarine
NA	« Non-acclimated » ou non acclimaté
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NH <sub>4</sub> Cl	Chlorure d'ammonium
PAL	Phénylalanine ammonia lyase
PBS	Tampon phosphate salin
PBS-T	Tampon phosphate avec Tween

PI	Iodure de propidium
PNC	Pregnenolone-16- $\alpha$ -carbonitrile
PR	Récepteur de la progestérone,
PROD	Pentoxyrésorufin-O-déalkylase
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
REL ou SER	Réticulum endoplasmique lisse
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
SDS-PAGE	« Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis », ou électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
SulWPE	Extrait de protéines de blé partiellement purifié avec le sulfate d'ammonium
TaIRI	« <i>Triticum aestivum</i> ice recrystallisation inhibition protein » ou protéines inhibitrices de la recrystallisation de la glace chez <i>Triticum aestivum</i> ,
TaTIL	« <i>Triticum aestivum</i> temperature induce lipocaline » ou lipocaline induite par la température chez <i>Triticum aestivum</i>
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TJ	Jonction serrée
TP	Température pièce
UDP-GT	Uridine diphospho-glucuronosyl transferase
WCOR	« Wheat cold regulated protein » ou protéines de blé régulées par le froid
WCS	« Wheat cold specific proteins » ou protéines de blé spécifiques au froid
WFTP	« Wheat freezing tolerance proteins » ou Protéines de tolérance au gel chez le blé

WME

Milieu William's

WPE

« Wheat protein extract » ou extrait de protéines de blé

## RÉSUMÉ

Plusieurs domaines de recherche, tels que la toxicologie, la pharmacologie, la recherche et développement de nouveaux médicaments et la médecine, exige l'utilisation d'une grande quantité d'hépatocytes. Les hépatocytes de rats sont un modèle physiologique important pour étudier *in vitro* les composés au niveau de leur hépatotoxicité, l'induction des enzymes du métabolisme telles que les isoformes du cytochrome P450 et leurs interactions médicamenteuses, ainsi que pour établir la pertinence du modèle par rapport à l'homme.

La cryoconservation permet de préserver une grande quantité d'hépatocytes fonctionnels. Cependant, les hépatocytes sont des cellules extrêmement sensibles aux dommages induits par le gel et le dégel, même après l'addition des cryoprotectants classiques tel que le DMSO. La cryoconservation réduit la viabilité et certaines fonctions hépatosspécifiques. Le changement le plus prononcé est la diminution de leur efficacité d'attachement. L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et les contacts cellules-cellules sont cruciaux pour plusieurs fonctions cellulaires. Ces processus sont en partie régulés par les molécules d'adhésion cellulaire. Les mécanismes responsables de la réduction de l'efficacité d'attachement des hépatocytes cryoconservés ne sont pas bien élucidés. Ainsi, l'amélioration des techniques de cryoconservation est nécessaire afin d'améliorer les fonctions et de réduire les dommages cellulaires. Dans cette thèse, nous décrivons une nouvelle méthode efficace pour la cryoconservation de cellules de mammifères basée sur l'utilisation d'un extrait de protéines de blé (WPE) ou d'un extrait partiellement purifié avec le sulfate d'ammonium ou l'acétone (SulWPE ou AcWPE) ou de protéines recombinantes associées à la tolérance au gel chez le blé. Ces méthodes permettent l'entreposage à long terme et la récupération d'une grande quantité de cellules viables et dont les fonctions sont maintenues.

Pour tester l'efficacité de cette nouvelle méthode, nous avons mesuré plusieurs paramètres, tels que la viabilité immédiatement après dégel, la viabilité en culture, l'efficacité d'adhésion et l'évaluation des fonctions hépatosspécifiques (sécrétion d'albumine, biotransformation de l'ammonium en urée, activité basale et inductibilité du cytochrome P450).

En culture, la morphologie des hépatocytes cryoconservés avec l'extrait de protéines de blé (WPE), l'extrait partiellement purifié (SulWPE ou AcWPE) et les protéines recombinantes associées à la tolérance au gel chez le blé (WCS120, WSC19, WCOR410, TaTIL et TaIRI-2), est semblable à celle des cellules fraîches. De plus, la stabilité des trois principales molécules d'adhésion, soit l'intégrine  $\beta 1$ , la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine fut étudiée. L'expression des molécules d'adhésion est généralement inférieure chez les hépatocytes cryoconservés avec le

diméthylsulfoxyde (DMSO), comparativement au WPE. L'intégrine  $\beta 1$  et la  $\beta$ -caténine sont les plus touchées par la cryoconservation. Les molécules d'adhésion sont préservées chez les hépatocytes cryoconservés avec les SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes ; l'expression étant faiblement diminuée comparativement aux hépatocytes frais. Par le fait même, l'adhérence cellulaire des cellules cryopréservées avec les SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes est supérieure (70%) à celle des cellules cryopréservées avec le WPE ou le DMSO (50%).

Les fonctions hépatospécifiques telles que la sécrétion d'albumine et la biotransformation de l'ammonium en urée sont maintenues durant 4 jours de culture, pour les cellules cryoconservées avec les WPEs. Nous avons également déterminé que les WPE, SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes peuvent améliorer les activités des principaux isoformes du cytochrome P450, chez les hépatocytes en suspension et en culture après cryoconservation. Ceci a été réalisé en comparant les activités basales et inductibles des isoformes CYP1A1/2, 2C6, 2D2 et 3A1/2 dans les hépatocytes de rat cryoconservés avec les WPE, SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes comparativement aux cellules fraîches et les cellules cryoconservées au DMSO. Nous démontrons d'une manière concluante que les hépatocytes de rat cryoconservés avec les WPE, SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes maintiennent le même niveau de compétence métabolique et de capacité à répondre aux inducteurs classiques du CYP, que les hépatocytes fraîchement isolés.

Ces résultats démontrent clairement que le WPE, et plus particulièrement, les SulWPE, AcWPE et les protéines recombinantes, sont plus efficaces que la technique classique de cryoconservation au DMSO pour les hépatocytes de rat, tant pour le maintien de l'expression des molécules d'adhésion que pour leurs fonctions hépatospécifiques. Les extraits WPE, SulWPE, AcWPE et protéines recombinantes contiennent des agents cryoprotecteurs potentiellement universels pour les cellules de mammifères, tout en étant économiques et non-toxiques.

Mots-clés : Foie, hépatocytes, cryoconservation, protéines de blé, viabilité, activité métabolique, cytochrome p450, molécules d'adhésion.

# **CHAPITRE I**

## **PROBLÉMATIQUE**

Le foie est l'organe du corps humain le plus volumineux, le plus complexe et le plus actif au point de vue métabolique. Il est constitué principalement par des hépatocytes. Ces cellules correspondent à 70% de la population cellulaire totale et à 80% du volume hépatique (Meeks *et al.*, 1991). Les hépatocytes sont responsables de la majorité des fonctions du foie telles que la synthèse et la sécrétion des protéines essentielles (Clément et Guillouzo, 1992). Elles sont également impliquées dans la biotransformation et la sécrétion des composés endogènes et exogènes (Antikainen et Pihakaski, 1994; Glicklis *et al.*, 2000).

Dans les études en pharmacologie : toxicologie, on utilise couramment les hépatocytes car il est plus facile de travailler avec des cellules isolées qu'avec des animaux entiers (Antikainen et Pihakaski, 1994; Wrighton *et al.*, 1995). L'utilisation des cellules isolées permet de tester plusieurs conditions ou traitements sur le même animal, alors qu'un animal par condition ou traitement serait requis. De plus, au cours des dernières années, l'utilisation des animaux de laboratoire devient très restreint et problématique.

Les hépatocytes représentent le modèle expérimental *in vitro* le plus physiologiquement représentatif du foie. L'utilisation d'autres modèles hépatiques tels que les microsomes permettent uniquement de suivre la biotransformation de phase I, tandis que les fines tranches de foie peuvent entraîner des artéfacts importants dus à la pénétration limitée des drogues à travers plusieurs couches de cellules. En raison de leurs propriétés métaboliques, les hépatocytes représentent un système cellulaire ininterrompu, comportant tous les enzymes et les cofacteurs, qui sont présents au niveau physiologique. L'utilisation des hépatocytes donnent des résultats qui sont représentatifs de ceux obtenus *in vivo*, en termes de profils et taux métaboliques (Billings *et al.*, 1977; Houston, 1994; Kedderis, 1997). Pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments, les hépatocytes en suspension et en cultures monocouche sont utilisés. En raison de leur durée de vie limitée



(approximativement 5 h), les suspensions d'hépatocytes peuvent être utilisées que pour des études sur la stabilité métabolique hépatique, l'inhibition des isoformes du cytochrome P450 (CYPs) et les transporteurs de médicaments (Li, 2007). Cependant, les études d'induction du CYP qui permettent de détecter les interactions médicamenteuse, qui sont exigées par la FDA, requiert l'utilisation d'hépatocyte en culture sur une durée de 2 à 3 jours. La recherche dans le domaine pharmacologique demande donc une grande quantité de cellules. Pour cette raison, la cryoconservation d'hépatocytes de bonne qualité serait d'une valeur considérable (Powis *et al.*, 1987; Santone *et al.*, 1989; Zaleski *et al.*, 1993).

Cependant, les hépatocytes sont extrêmement sensibles aux dommages lors de la congélation / décongélation. Depuis quelques années, plusieurs méthodes pour la cryoconservation des hépatocytes ont été développées (Diener *et al.*, 1993; Utesch *et al.*, 1992). Des agents cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol sont actuellement utilisés pour protéger les cellules et les tissus contre la déshydratation provoquée par la formation de la glace intracellulaire pendant la congélation. Cependant, le DMSO est toxique et doit être éliminé rapidement lors de la décongélation (Fahy, 1986) car il cause un stress osmotique qui affecte la compétence métabolique des cellules (Schneider et Mazur, 1987). Afin d'améliorer la qualité des hépatocytes cryoconservés, certains chercheurs ont modifié la technique de cryoconservation basée sur l'utilisation du DMSO en ajoutant des composés aux propriétés antioxydantes ou stabilisantes (Diener *et al.*, 1993; Utesch *et al.*, 1992).

Plusieurs études ont démontré que le contenu en cytochrome P-450, le taux d'hydroxylation de la testostérone, et les activités de l'hydrolase sulfotransférase, de la UDP-glucuronosyl transférase (UDP-GT), de l'époxyde hydrolase cytosolique et microsomale, aussi bien que la glutathion S-transférase cytosolique (GST), sont semblables dans les cellules fraîchement isolées et les cellules cryoconservées juste après le dégel (Diener et Oesch, 1995; Diener *et al.*, 1993; Utesch *et al.*, 1992). Une

autre étude a démontré que les hépatocytes cryoconservés maintenaient leur capacité de transporter les drogues et de biotransformer ces drogues via les cytochromes p450 (Houle *et al.*, 2003). Cependant, les hépatocytes cryoconservés démontrent une réduction marquée de la viabilité, de l'efficacité d'attachement et de diverses fonctions hépatiques comparativement aux cellules fraîchement isolées (Chesne et Guillouzo, 1988; Dou *et al.*, 1992; Innes *et al.*, 1988; Powis *et al.*, 1987; Utesch *et al.*, 1992). En conséquence, une cellule cryoconservée en présence de DMSO ne présente pas un métabolisme normal comparativement à des cellules ou des tissus frais et peut mener à une interprétation incorrecte des résultats.

De plus, les hépatocytes ne se divisent pas en culture, il est donc nécessaire de trouver des alternatives aux cryoprotecteurs existants, pour réduire les dommages cellulaires et fonctionnels des hépatocytes, afin d'augmenter la quantité de cellules viables disponibles pour les analyses. Afin de trouver de nouvelles stratégies, les scientifiques considèrent les substances produites par les organismes qui survivent aux conditions de congélation comme alternative au DMSO. Ainsi, le blé d'hiver, qui a développé des stratégies pour tolérer le froid hivernal, devient une source potentielle de substances cryoprotectrices.

Au cours de l'acclimatation au froid, les plantes répondent en modifiant la composition des constituants de leurs membranes en augmentant le degré d'insaturation des phospholipides (Antikainen et Pihakaski, 1994; Harwood *et al.*, 1994; Lynch et Steponkus, 1987; Uemura et Steponkus, 1994; Zhou *et al.*, 1994). De plus, il modifie leur contenu en sucres ; une augmentation du sucrose, raffinose, sorbitol et des fructans est remarquée (Antikainen et Pihakaski, 1994; Bachmann *et al.*, 1994; Mitchell et Madore, 1992; Pollock *et al.*, 1988). Par ailleurs, les teneurs en antioxydants sont modifiées : Ainsi, il y a une augmentation des contenus en glutathion (GSH), vitamines C (ascorbate) et E ( $\alpha$ -tocophérol). Également les activités de plusieurs enzymes (superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase

(GPX), glutathion réductase (GR), ascorbate peroxydase (APX) et catalase) augmentent (Noctor et Foyer, 1998). De plus, il y a accumulation de protéines associées à la tolérance au gel telles que WCS120, WCS19, WCOR410, *TaTIL*, *TaIRI* (Danyluk *et al.*, 1998; Frenette Charron *et al.*, 2002; Houde *et al.*, 1995; N'Dong *et al.*, 2002; Tremblay *et al.*, 2005). Plusieurs études ont rapporté également une augmentation de la teneur en osmoprotecteurs tels que la proline (Delauney et Verma, 1993; Hare *et al.*, 1999), le 3-diméthylsulfoniopropionate (McNeil *et al.*, 1999), les polyamines (Bouchereau *et al.*, 1999; Kumar et Minocha, 1998), le trigonelline (Tramontano et Jouve, 1997) et les bêtaïnes (McNeil *et al.*, 1999; Naidu *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1995; Nuccio *et al.*, 1999).

La présente étude vise donc à explorer les propriétés cryoprotectrices des protéines de blé d'hiver afin de développer une méthode plus efficace et alternative à celle basée sur l'utilisation du DMSO pour la cryoconservation des hépatocytes et d'autres cellules de mammifères.

Notre 1<sup>ère</sup> hypothèse est que tous les composés, qui permettent aux plantes de survivre au gel, pourraient également servir d'agent de cryoprotection pour les cellules animales, telles que les hépatocytes. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons évalué le potentiel cryoprotecteur d'un extrait brut de blé d'hiver (WPE) chez les hépatocytes de rat. Le potentiel cryoprotecteur sera évalué en mesurant les paramètres suivants : viabilité après dégel, viabilité en culture, efficacité d'adhésion, fonctions hépatosspécifiques (sécrétion d'albumine, métabolisme de l'ammonium en urée, activité basale et inductibilité du cytochrome P450).

L'extrait brut est un mélange de protéines, de polysaccharides et d'autres composés. Notre hypothèse de base est que parmi tous les composés du WPE, les protéines jouent un rôle important dans le potentiel cryoprotecteur des WPEs. Afin de répondre à cette question nous avons partiellement purifié le WPE (avec le sulfate

d'ammonium (SulWPE) ou l'acétone (AcWPE)). Ainsi ces extraits seront enrichis en protéines. Par conséquent, nous évaluerons le potentiel cryoprotecteur des extraits SulWPE et AcWPE selon les mêmes analyses que pour les WPEs.

De plus, comme je l'ai mentionné plus haut, pour se protéger contre le gel, le blé d'hiver accumule des protéines associées à la tolérance au gel (WFTP). Ceci nous amène à proposer que ces protéines qui s'accumulent chez le blé lors de l'acclimatation au froid, devraient posséder des propriétés cryoprotectrices qui pourraient leur permettre de surpasser les cryoprotecteurs classiques. Par ailleurs, puisqu'elles possèdent des modes d'actions différents, leur utilisation seule ou en combinaison devrait nous permettre de parvenir à de très bons taux de viabilité après le dégel de cellules cryoconservées. Nous avons donc tenté de déterminer le potentiel cryoprotecteur des protéines de tolérance au gel du blé, telles que la WCS120, WCS19, WCOR410, *TaTIL* et *TaIRI-2*, en effectuant la même série d'analyses que pour les WPEs.

La mise au point de la technique de cryoconservation des hépatocytes de rats nous permet d'espérer le développement et l'optimisation du protocole de cryoconservation pour les hépatocytes humains. Une telle amélioration pourrait fournir une solution pour la disponibilité d'hépatocytes pour la transplantation dans des cas de déficiences aiguës hépatiques ou de défauts métaboliques (Terry *et al.*, 2006a). Cela pourrait également permettre l'établissement de nouveaux protocoles permettant de déterminer les phases I et II des nouveaux médicaments directement sur des hépatocytes humains. Ces techniques permettraient une augmentation de la sécurité des tests. De plus, en travaillant avec un système *in vitro* humain, les polymorphismes pourraient également être étudiés.

## **CHAPITRE II**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 2.1 LE FOIE

Le foie est l'organe du corps le plus volumineux, le plus complexe et le plus dynamique au point de vue métabolique. Chez l'humain, le foie adulte pèse entre 1400 et 1600 g, soit 1/50 du poids corporel. Il est composé de deux lobes anatomiques, dont le droit est séparé du gauche par le ligament falciforme (figure 2.1). Un lobe est formé de plusieurs petits segments nommés lobules hépatiques. Ils sont séparés par des fissures interlobulaires qui s'élargissent et se regroupent en un point de jonction nommé espace porte (Meeks *et al.*, 1991; O'Grady *et al.*, 2001).

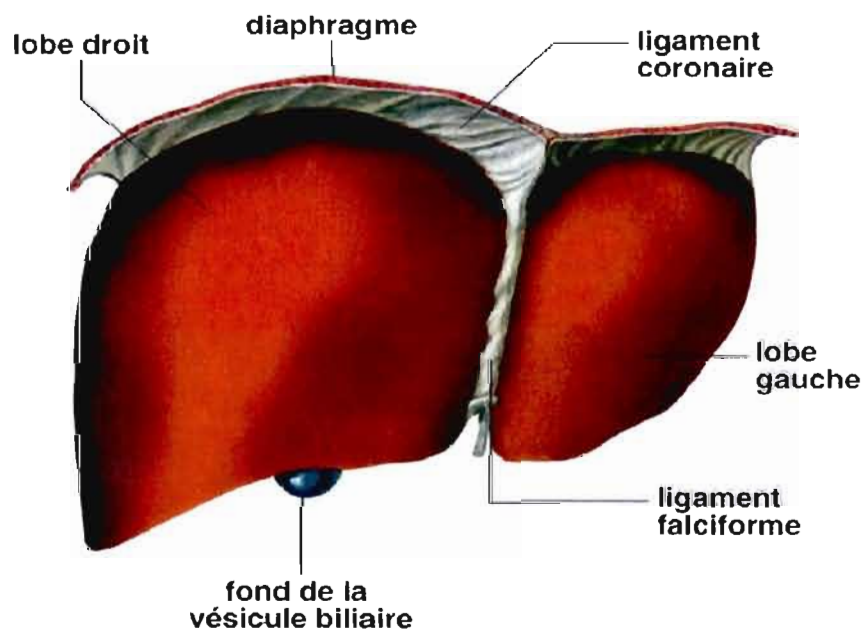


Figure 2.1 Dessin anatomique du foie : vue de la face supérieure (Encyclopædia Britannica, 2003).

Le foie possède un apport sanguin double (figure 2.2). La veine porte transporte au foie le sang de la rate et du tube digestif. Elle naît de la jonction de la veine splénique, de la veine mésentérique inférieure et de la veine mésentérique supérieure. L'artère hépatique apporte au foie le sang artériel. Elle naît du tronc coélique. Le sang est drainé, majoritairement, par les veines sus-hépatiques.

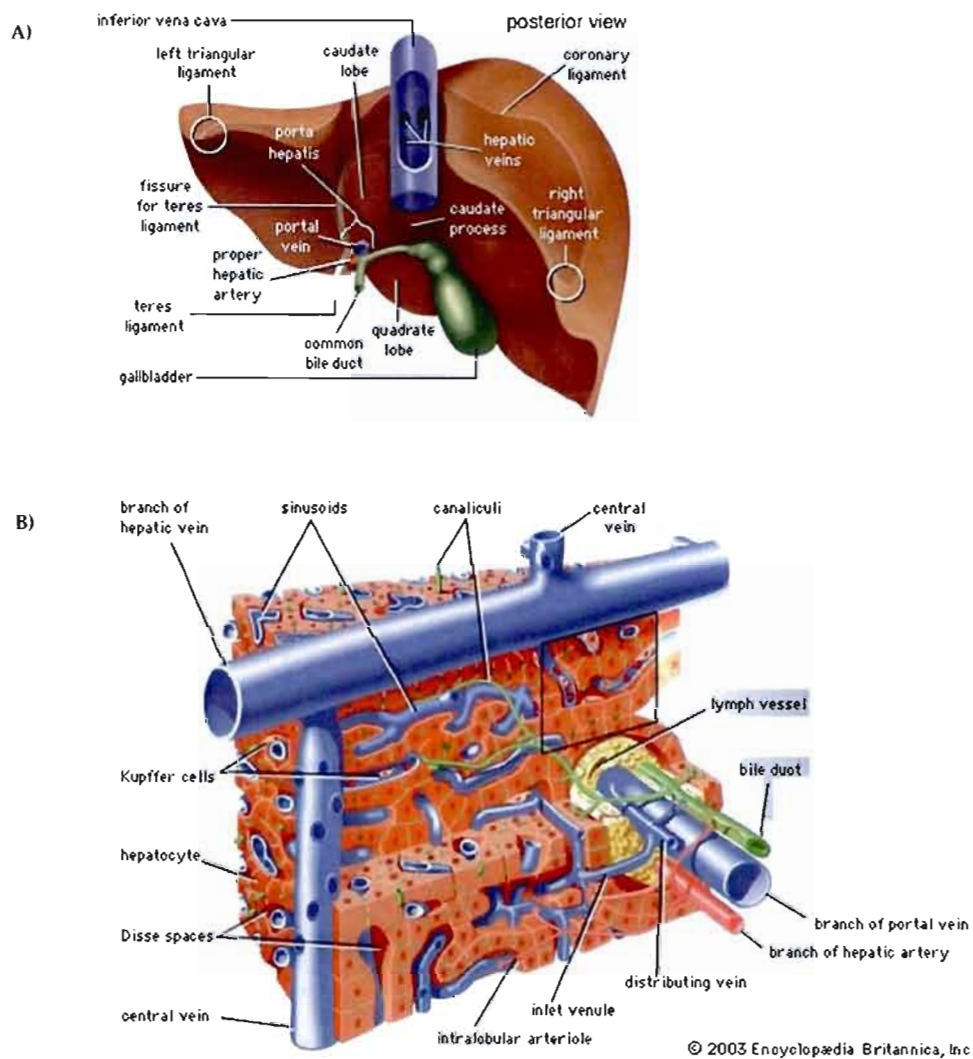
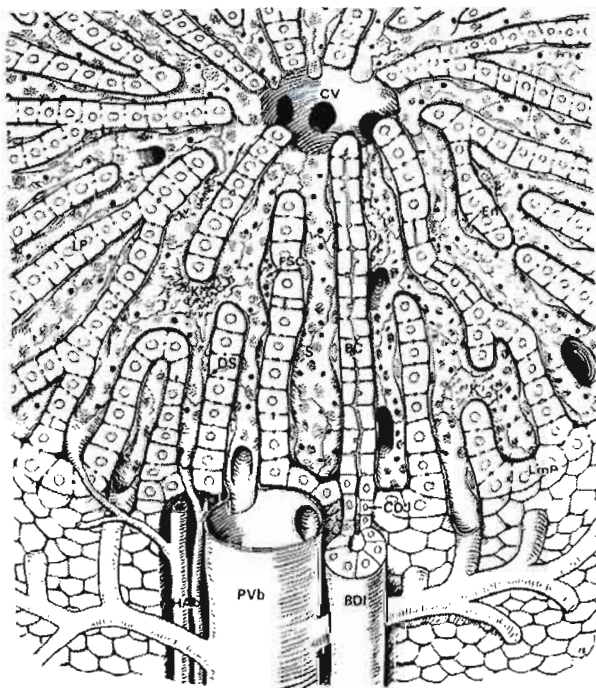


Figure 2.2 Schéma d'une coupe anatomique du foie et représentation du réseau sanguin alimentant le foie (Encyclopædia Britannica, 2003).



### 2.1.1 LES CELLULES PARENCHYMATEUSES

L'unité structurale et fonctionnelle du parenchyme hépatique est l'acinus (fig. 2.3), qui est organisé autour de deux lits vasculaires distincts : six ensembles de triades portiques, chacune avec une veinule portique, artériole hépatique, et un conduit biliaire, forment la périphérie et la veine centrale. Le parenchyme se compose de cellules (les hépatocytes) bordant les deux côtés d'un endothélium sinusoïdal fenêtré (Jones et Spring-Mills, 1983). Le flot sanguin va des veinules portiques et des artérioles hépatiques aux triades portiques, par les sinusoïdes, aux veinules hépatiques terminales, et à la veine centrale (Campra et Reynolds, 1989).



CV : veinule portique, K : cellules de Kupffer, FSC : cellule de Ito, BC : conduit biliaire, En : cellules endothéliales, S : sinusoïde avec fenestrations, HAb : artère hépatique, PVb : veine portale

Figure 2.3 Acinus hépatique (Muto et Yamamoto, 1978)



Basé sur ce modèle micro circulatoire, l'acinus est divisé en trois zones (fig. 2.4): zone 1, la région périportale ; zone 2, la région centrale ; et zone 3, la région entourant la veine centrale ou la veinule hépatique terminale (Bennett *et al.*, 1987; Campra et Reynolds, 1989; Jones et Spring-Mills, 1983; Loud, 1968). L'hétérogénéité morphologique, biochimique, et fonctionnelle des hépatocytes est dépendante de leur localisation zonale.

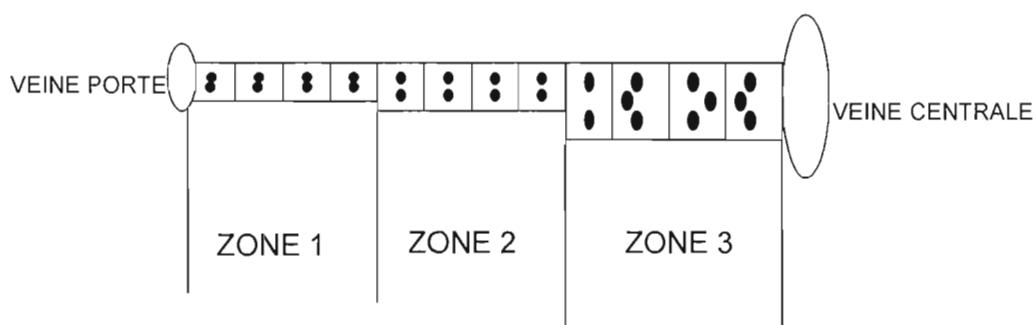


Figure 2.4 Représentation de la division de l'acinus

Les cellules parenchymateuses hépatiques ou hépatocytes sont des cellules polyédriques de 25 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre (Berry et Friend, 1969). Les hépatocytes ont un cytoplasme éosinophile, avec beaucoup de mitochondries, et granuleux, puisque le cytoplasme est riche en organites. Elles représentent 80% de la masse du foie (Meeks *et al.*, 1991).

L'hépatocyte est au carrefour des voies métaboliques. Il possède les enzymes impliquées dans les réactions de biotransformation de la phase I et II. Il s'adapte aux besoins de l'organisme grâce à une infinité de mécanismes de rétrorégulation. Une des particularités de ces cellules est leur double polarité orientée, d'une part, vers le courant sanguin (fonction endocrine - contact avec le sang, participation à la

pinocytose, diffusion, etc.) et d'autre part, vers l'arbre biliaire (fonction exocrine - la bile) (Belinsky *et al.*, 1986; Jungermann et Katz, 1989).

Les hépatocytes possèdent aussi une hétérogénéité fonctionnelle (Haussinger, 1990). Les cellules sont plus petites dans la zone 1, intermédiaire dans la zone 2, et plus grandes dans la zone 3, et il y a des variations de la morphologie des mitochondries, du réticulum endoplasmique, et des granules de glycogène (Loud, 1968). Les cellules dans la zone 1 sont toujours diploïdes, tandis que dans la zone 3, elles sont de plus en plus polyploïdes (Wilson et Leduc, 1948). Leur potentiel métabolique diffère selon leur localisation dans le foie. Les hépatocytes de la zone périportale (afférente) et périveineuse contiennent différentes enzymes qui participent à divers processus métaboliques. En outre, les capacités prolifératives des hépatocytes dans la zone 1 sont considérablement plus grandes que celle de la zone 3 (Gebhardt, 1988).

### **2.1.2 LES CELLULES NON PARENCHYMATEUSES**

Les sinusoides contiennent plusieurs autres types cellulaires (cellules non parenchymateuses) qui représentent 30 à 35% des cellules hépatiques. Environ 80 à 90% des cellules non parenchymateuses sont des macro-phagocytes stellaires appelés également des cellules de Kupffer (variété de globules blancs de volume important) et qui représentent approximativement 10% de la population cellulaire du foie. Les cellules de Kupffer bordent les capillaires hépatiques. Leur fonction principale est la phagocytose des particules colloïdales, des bactéries, des complexes immunologiques, des cellules tumorales, des liposomes et du fer sanguin contenu dans les capillaires hépatiques.

Environ 7% des cellules du foie sont constituées de cellules étoilées (lipocytes, cellules de Ito). Leurs fonctions sont : l'entreposage, le métabolisme de la vitamine A (l'ester du rétinyl) et la synthèse du collagène. Elles peuvent se différencier et fabriquer du tissu conjonctif lors de certaines pathologies comme la fibrose suite à l'inflammation chronique et la nécrose.

Les cellules endothéliales représentent environ 17% de la population cellulaire du foie. Leur principale fonction est de former une barrière entre le sang des capillaires et le parenchyme du foie. Elles bloquent aussi le passage des chylomicrons vers le foie. Elles participent également au catabolisme des glycoprotéines, des lipoprotéines, des albumines et des acides hyaluroniques.

## **2.2 LES DIFFÉRENTS RÔLES DU FOIE**

Le foie possède de multiples fonctions. Le premier rôle est de maintenir une glycémie constante. Le glucose sanguin est emmagasiné dans les hépatocytes sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et, inversement, le glycogène intracellulaire peut subir une glycogénolyse pour libérer du glucose dans le sang. Ces mécanismes sont régulés par l'insuline qui est une hormone hypoglycémiante stimulant la glycogénogenèse et le glucagon, une hormone hyperglycémiante, favorisant la glycogénolyse. Au niveau des hépatocytes, il se produit également la néoglucogenèse, voie métabolique qui permet de transformer les acides aminés, l'acide lactique et les lipides en glucose (O'Grady *et al.*, 2001). Le foie est aussi responsable de la synthèse de plusieurs protéines dont certaines sont des protéines de structure et d'autres des protéines plasmatiques, comme l'albumine (Bennett *et al.*, 1987; Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983). Les hépatocytes sont également le lieu de synthèse de certains facteurs de la

coagulation dépendants de la vitamine K (facteur II, VII, IX, X), ou indépendants de cette vitamine (facteur V) (O'Grady *et al.*, 2001).

Les hépatocytes transforment aussi les chylomicrons en lipoprotéines plasmatiques circulant librement dans le sang et assimilables par les tissus de l'organisme. L'hépatocyte fabrique des lipides de structure, mais aussi des lipides utiles à l'organisme, des "lipides de réserve" et le cholestérol. L'hépatocyte est également le lieu de stockage de certaines vitamines. Le foie peut emmagasiner des réserves de vitamine A pour 1 à 2 ans et des vitamines D et B<sub>12</sub> pour 1 à 4 mois (O'Grady *et al.*, 2001).

C'est également au niveau du foie que se déroule le cycle de l'urée, chez les mammifères. Le cycle de l'urée prend en charge l'ammoniaque issue de la dégradation des groupements azotés des acides aminés. Le maintien de cette fonction uréogénique dans les cultures d'hépatocytes démontre une bonne viabilité cellulaire (Bennett *et al.*, 1987; Gaasbeek Janzen *et al.*, 1987; Haussinger, 1990).

Le foie possède aussi une fonction immunitaire. À l'intérieur des sinusoides, on retrouve les cellules de Küpffer. Ces macrophages résidents du foie sont en contact direct avec le sang. Ces cellules éliminent les débris, les globules rouges en dégénérescence et les bactéries provenant de l'intestin. Le foie compte également plusieurs vaisseaux lymphatiques (O'Grady *et al.*, 2001).

Mais l'un des rôles les plus importants est la capacité du foie de métaboliser de nombreuses substances et ce grâce à des mécanismes biologiques de conjugaison. Une fonction importante est celle assurée par le cytochrome P-450 et cette fonction précède très souvent la conjugaison. La conjugaison des produits toxiques se fait soit avec l'acide glucuronique (glucuroconjugaison), soit avec des ions sulfate (sulfoconjugaison). Ainsi sont neutralisés divers médicaments (ex. les barbituriques)

et les hormones stéroïdiennes. Les hépatocytes assurent aussi la glucuroconjugaison des pigments biliaires, et des produits de dégradation de l'hémoglobine évacués par la bile (O'Grady *et al.*, 2001).

Dû à l'hétérogénéité du foie, l'expression de gènes à travers le sillon peut être uniforme, zonale, ou limitée à différentes cellules situées à l'intérieur d'une des zones (Andersen *et al.*, 1983; Chianale *et al.*, 1986; Haussinger, 1990; Jungermann, 1986; Lemire et Fausto, 1991; Petropoulos *et al.*, 1985; Poliard *et al.*, 1986; Thurman et Kauffman, 1985; Traber *et al.*, 1988; Wojcik *et al.*, 1988). Les exemples de la distribution zonale de l'expression génique incluent des enzymes impliquées dans la dégradation du glycogène et la gluconéogenèse (zone 1), la synthèse du glycogène, la glycolyse (zone 3) (Jungermann, 1986; Thurman et Kauffman, 1985; Traber *et al.*, 1988), les enzymes du cycle de l'urée et le cytochrome P 450 induit au phénobarbital (zone 3) (Chianale *et al.*, 1986; Haussinger, 1990; Wojcik *et al.*, 1988). L'expression de certaines protéines peut être également limitée à certaines zones: l' $\alpha$ -fétoprotéine est périportale (Bennett *et al.*, 1987; Lemire et Fausto, 1991; Petropoulos *et al.*, 1985; Poliard *et al.*, 1986) ; la principale protéine urinaire est limitée à 4-5 cellules péricentrales (Bennett *et al.*, 1987) ; et la glutamine synthétase est limitée à une seule couche de cellules péricentrales (Bennett *et al.*, 1987; Gaasbeek Janzen *et al.*, 1987) (voir tableau 2.1).

Tableau 2.1 Fonctions métaboliques des hépatocytes selon la localisation dans le foie (Jungermann et Katz, 1989)

Zone périportale	Zone périveineuse
respiration mitochondriale	glycolyse
oxydation des lipides	synthèse des acides gras
cycle du citrate	synthèse du glucose
libération du glucose	cétogenèse
néoglycogénèse	conversion de l'ammoniaque en glutamine
synthèse du lactate	métabolisme des xénobiotiques: formation d'acide mercapturique, glucuronidation, oxydation des xénobiotiques par le cytochrome P450
synthèse du cholestérol	
conversion de l'ammoniaque en l'urée	
conjugaison avec le glutathion	
peroxydation du glutathion	
formation de la bile	

### 2.3 LE MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES AU NIVEAU DU FOIE

Le foie, le tractus gastro-intestinal, le rein et le poumon sont les principaux organes où on retrouve les enzymes de biotransformation des xénobiotiques. Le foie représente le site majeur de biotransformation enzymatique des substances

liposolubles endogènes et exogènes. Les différentes réactions de biotransformation sont regroupées en 2 phases (I et II). Les métabolites qui en résultent possèdent une plus grande hydrosolubilité, facilitant leur excrétion par le rein (Benet *et al.*, 1990). Les réactions de phase I comprennent : l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse. Lors de la phase II, les groupes polaires présents sur les métabolites de phase I se conjuguent avec le glutathion, l'acétate, le glucuronate, le sulfate ou la glycine pour produire des composés pouvant être excrétés. Certains xénobiotiques subissent directement les réactions de conjugaison de la phase II, sans passer par la phase I. La majeure partie du métabolisme de phase I fait appel au cytochrome P450 (CYP).

Les principales composantes du système d'oxygénase observées dans les microsomes du foie (Lu et Coon, 1968) sont : l'hémoprotéine cytochrome P450, la flavoprotéine NADPH cytochrome P450 réductase, la flavoprotéine NADH cytochrome b5 réductase et le cytochrome b5 liés aux phospholipides et aux différentes cytochromes P450 réductases. La majeure partie du système enzymatique est situé dans le REL, catalysant la biotransformation des médicaments. Le seul critère pour qu'une substance soit biotransformée par ces enzymes, et particulièrement par les oxydases, est la liposolubilité. Le substrat se lie à la forme oxydée du CYP, formant un complexe  $RH_2-CYP-450$  (voir tableau 2.2).

Les enzymes catalysant les réactions de conjugaison de phase II sont notamment les glutathion S-transférases, les UDP-glucuronosyl transférases, les sulfotransférases, les N-acétyltransférases, les acyltransférases et les méthyltransférases (voir tableau 2.2).

Tableau 2.2 Les enzymes de biotransformation du foie

Phase I	Phase II
Superfamille du cytochrome P450	Glutathion S-transférase
Mono-oxygénase à flavine	N-Acétyltransférase
Alcool déshydrogénase	Uridine diphosphateglucuronyltransférase
Aldéhyde déshydrogénase	Méthyltransférase
Dihydropyrimidine déshydrogénase	Acyltransférase
Butyrylcholinestérase	Sulfotransférase
Cholinestérase	
Hydrolase	
Monoamine-diamine oxydase	
Polyamine oxydase	
Xanthine oxydase	
Alkylhydrazine oxydase	
Paroxonase	
Prostaglandine synthétase-lipoxygénase	
Aromatase	
Azo et nitro réductase	
Carbonyl réductase	
Époxyde hydrolase	



### 2.3.1 LE CYTOCHROME P450

La superfamille des cytochromes P450 comprend plus de 500 gènes qui ont été identifiés et caractérisés. Ces gènes sont retrouvés chez 85 espèces d'eucaryotes (vertébrés, invertébrés, champignons et plantes) et 20 espèces de procaryotes. Ils sont classés en 74 familles, 14 de celles-ci sont présentes chez les mammifères. Vingt-six sous-familles sont présentes chez les mammifères alors que 20 de ces dernières sont présentes dans le génome humain (Nelson *et al.*, 1996; Rendic et Di Carlo, 1997). Quatre familles de cytochromes P450 sont impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques chez les mammifères (Beaune, 1993).

Le complexe du CYP est formé de plusieurs isoenzymes possédant des activités distinctes. Ces isoenzymes sont classées dans différentes familles. Certaines sont inductibles par divers xénobiotiques (voir tableau 2.3).

La sous-famille *CYP1A* comporte deux gènes : les gènes *CYP1A1* et *CYP1A2*. Ces deux gènes sont retrouvés chez toutes les espèces. Le *CYP1A2* est exprimé dans le foie de façon constitutive alors que le *CYP1A1* est inductible (Beaune, 1993). Le *CYP1A1* est probablement l'isoenzyme du cytochrome P450 la mieux conservée entre les espèces (Gonzalez, 1992).

La sous-famille *CYP2A* se compose de trois gènes chez l'humain (*CYP2A6*, *CYP2A7* et *CYP2A13*). Les gènes de cette sous-famille ont été caractérisés chez plusieurs espèces de mammifères (la souris, le rat, le hamster, le lapin et l'humain). Cependant, il faut noter que certaines différences existent entre les espèces au niveau de l'expression de cette sous-famille (Smith *et al.*, 1998).

La sous-famille *CYP2B* comporte deux isoformes chez l'humain (*CYP2B6* et le *CYP2B7*). Le *CYP2B7* est situé dans les poumons et métabolise le benzo[a]pyrène alors que le *CYP2B6* est présent dans le foie à un niveau très bas et possède une variabilité importante (Rendic et Di Carlo, 1997; Smith *et al.*, 1998).

La sous-famille *CYP2C* est la plus complexe chez l'humain. Six isoenzymes ont été caractérisées, dont quatre ont été identifiées chez l'humain, purifiées et clonées (*CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* et *CYP2C19*). L'enzyme la plus présente de cette sous-famille est le *CYP2C9*. En plus de toutes se retrouver au niveau du foie, *CYP2C8* et *CYP2C9* sont aussi présents au niveau des intestins (Beaune, 1993; Rendic et Di Carlo, 1997; Smith *et al.*, 1998).

La sous-famille *CYP3A* est la plus présente dans le foie humain. Elle représente environ 25-28% des cytochromes P450 totaux du foie et peut même atteindre 70%. Cette sous-famille est aussi retrouvée au niveau de la muqueuse intestinale, l'utérus, le placenta, les reins, les poumons et autres tissus (Rendic et Di Carlo, 1997; Smith *et al.*, 1998). Toutes les isoenzymes de la sous-famille *CYP3A* ont la capacité de métaboliser de nombreuses molécules de même que d'activer métaboliquement l'aflatoxine B1 et d'autres procancérigènes (Gonzalez, 1992).

La sous-famille *CYP4A* se compose de deux gènes (*CYP4A9* et *CYP4A11*). Dans le foie, une variation inter-individuelle dans l'expression du *CYP4A11* est remarquée. Tout comme pour le *CYP2E1*, l'expression de la sous-famille *CYP4A* est induite, chez le rat, lors de crises diabétiques (Beaune, 1993; Rendic et Di Carlo, 1997; Smith *et al.*, 1998).

La sous-famille *CYP2E* se compose d'un seul membre (*CYP2E1*). *CYP2E1* est exprimé dans plusieurs tissus (foie, poumons, intestins, leucocytes, placenta et cerveau). Son expression a aussi été mise en évidence dans le foie fœtal où son

activité est semblable à celle au niveau du foie adulte. CYP2E1 se trouve parmi les formes de P450 les mieux conservées. Cela suggère une importante fonction physiologique en plus de son rôle dans le métabolisme de xénobiotiques. CYP2E1 ne métabolise que des molécules de faible poids moléculaire. CYP2E1 peut induire une toxicité importante étant donné qu'il est responsable de la formation de métabolites et d'intermédiaires réactifs à partir d'un grand nombre de produits chimiques (benzène, composés polyhalogénés). Certains substrats du CYP2E1, comme l'éthanol, le toluène et le benzène, peuvent induire son activité (Beaune, 1993; Botto *et al.*, 1994; Gonzalez, 1992; Rendic et Di Carlo, 1997; Smith *et al.*, 1998).

Les inducteurs sont habituellement divisés en cinq groupes selon leur mode d'action : les hydrocarbures polycycliques, le phénobarbital, les glucocorticoïdes, l'alcool et les proliférateurs de peroxysome. Le processus d'induction est principalement transcriptionnel.

Tableau 2.3 Principales familles de cytochromes P450 induites par les xénobiotiques chez le rat

Isoenzymes	Types d'inducteurs
CYP1A1 CYP1A2	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine (TCDD), 3-méthylcholanthrene (3-MC), isosafrole
CYP2A1 CYP2A2	$\beta$ -naphtoflavone
CYP2B1 CYP2B2	phénobarbital, biphényles polychlorés (BPC)
CYP3A1 CYP3A2	pregnenolone 16- $\beta$ -carbonitrile (PNC), dexaméthasone
CYP4A1 CYP4A2 CYP4A3	clofibrate
CYP2E1	éthanol, acétone, isoniazide

## 2.4 LES SYSTÈMES *IN VITRO* POUR LES ÉTUDES DE FONCTIONNALITÉ DU FOIE

Les systèmes vitaux du corps ont évolués pour répondre homéostasiquement aux stimuli défavorables. Des effets toxiques sur ces systèmes à multi niveaux peuvent seulement être étudiés dans des études *in vivo*. En revanche, lorsque la complexité du système étudié diminue, les avantages pour caractériser les mécanismes peuvent augmenter. Ainsi, *in vitro*, les systèmes ont joué un rôle important dans l'évaluation de l'impact toxicologique en démontrant la toxicité spécifique chez le rongeur (Green, 1990; Lock *et al.*, 1989). Par conséquent, la validité des essais *in vitro* comme outils prédictifs et le degré auxquels ils peuvent être utiles dépendent entièrement des questions posées comme des réponses recherchées.

Les techniques utilisant les lignées cellulaires, les suspensions d'hépatocytes et les cultures primaires sont devenues populaires tandis qu'il y a un intérêt croissant pour la technique utilisant des tranches de précision de foie. Les hépatocytes isolés, en suspension ou en culture, sont utilisés depuis près de 25 ans et ont servi dans de nombreuses études (Berry et Friend, 1969). Le Tableau 2.4 récapitule la variété des systèmes *in vitro* disponibles pour l'étude des fonctions du foie ainsi que certains de leurs avantages et limitations.

Tableau 2.4 Comparaison des systèmes in vitro pour les études sur les fonctions hépatiques (Paine, 1996)

SYSTÈME	LONGÉVITÉ DE LA PRÉPARATION	DÉSAVANTAGES	AVANTAGES
Organe perfuse	2-3 h	Technique difficile à maîtriser par rapport à la longévité. Doit utiliser le foie de l'animal comme contrôle.	Architecture de l'organe maintenu. Contribution de tous les types cellulaires du foie au métabolisme.
Tranches de foie	4-6 h	Trauma possible dû à la manipulation de la tranche et qui peut varier entre les tranches. Contamination bactérienne et anoxie sont souvent un problème.	Architecture de l'organe maintenu. Contribution de tous les types cellulaires du foie au métabolisme.
Tranches de foie (coupe de précision)	Au moins 24 h pour tranches épaisses de 250 µM	Exige de l'équipement cher. Les longues d'incubation ont besoin d'une évaluation soigneuse.	La facilité de la préparation et l'architecture de l'organe maintenu. L'utilisation des blocs cylindriques de tissus a comme conséquence des tranches circulaires identiques.
Culture d'organe	Jours semaines	Présence de fibroblastes ayant pour résultat une apparente dilution des tissus. Dédifférenciations et perte des enzymes du métabolisme des médicaments	Rapide mais a-t-elle une utilisation ?

Suspensions de cellules	2-4 h	Technique difficile à maîtriser par rapport à la longévité de la préparation. Présence de cellules perméables ou endommagées ayant pour résultat une toxicité observée beaucoup plus rapide qu'in vivo (faux positifs ?)	Peut contenir tous les types cellulaires du foie contribuant au métabolisme.
Cultures primaires	7 jours	Perte rapide du CYP. Culture individuelle des différents types cellulaires séparément et la contamination variable entre les cultures peut avoir comme conséquence la faible reproductibilité entre les expériences.	La culture permet de réparer les dommages infligés pendant l'isolement. Peut déterminer la contribution des différents types de cellulaires au métabolisme et à l'hépatotoxicité.
Lignées cellulaires établies	infini	Niveaux très faible du métabolisme des médicaments comparativement au foie intact, suspensions d'hépatocytes ou cultures primaires.	Peut être transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour différents CYP et déterminer le rôle de l'isoenzyme dans le métabolisme.

### 2.4.1 SUSPENSIONS D'HÉPATOCYTES

La technique pour préparer le système *in vitro* d'hépatocytes en suspension est identique à celle utilisée pour préparer les cultures primaires d'hépatocytes. Cependant, les suspensions cellulaires sont utilisées immédiatement sans avoir le temps de récupérer du trauma de l'isolement. Alors qu'on permet habituellement aux cultures d'hépatocytes de reformer des contacts cellule-cellule avant d'être utilisées dans des études de métabolisme et de toxicité (Paine, 1990; Wright et Paine, 1992).

En outre, il convient de noter que les hépatocytes fraîchement isolés perdent leur contenu en potassium et en calcium (Paine, 1990; Wright et Paine, 1992) indiquant que les mécanismes homéostatiques sont affectés. Ils perdent également leur contenu en glycogène, ce qui peut affecter les voies principales du métabolisme des médicaments de la phase I qui impliquent le NADPH ou la conjugaison (phase II) particulièrement avec de l'acide glucuronique (Wright et Paine, 1992).

De plus, les pools intracellulaires d'acides aminés sont également diminués (Paine, 1990) et d'autres voies de conjugaison des xénobiotiques peuvent être affectées. Les hépatocytes fraîchement isolés sont fonctionnels en suspension pendant 2 à 4 heures (Sandker *et al.*, 1992).



### 2.4.2 CULTURES PRIMAIRES D'HÉPATOCYTES

La limitation principale à l'utilisation de ce système dans des études de métabolisme et de toxicité est la perte rapide de contenu en CYP. Ainsi entre 8 à 16 h, les cultures primaires d'hépatocytes de rat ont perdu plus que la moitié de leur contenu en CYP (Paine et Legg, 1978). Cette perte se produit également dans des cultures d'hépatocytes préparées avec d'autres espèces d'animaux (Paine et Legg, 1978). La teneur en CYP des cultures d'hépatocytes humains semble être plus stable selon certaines études (Blaauboer *et al.*, 1985) mais d'autres études démontrent le contraire (Li, 2007; Li *et al.*, 1999).

La perte de contenu en CYP dans les cultures d'hépatocytes de rat résulte de la synthèse incomplète (Paine et Villa, 1980) et bien que certains laboratoires aient conçu des conditions de culture qui maintiennent tout le contenu en CYP plus de 72 h au même niveau que dans le foie, des études moléculaires plus détaillées ont démontré que les différentes isoenzymes du CYP exprimées sont très distinctes de celles du foie (Padgham et Paine, 1993; Paine et Villa, 1980). En effet, le déclin des formes constitutives CYP2C7, CYP2C11 et CYP2C13, qui représentent la moitié du contenu en cytochrome P450 des hépatocytes de rat, est observé. Les raisons pour lesquelles le contenu en cytochrome P450 des hépatocytes est maintenu sont dues à l'induction précoce d'autres isoenzymes du cytochrome P450 qui dépend du système de culture utilisé.

Quatre systèmes entièrement différents qui empêchent la perte du contenu en CYP450 total pendant la culture d'hépatocytes ont été conçus (Blankson *et al.*, 1991), notamment : 1. La culture des hépatocytes à 30°C ; 2. La culture des hépatocytes dans un milieu déplété en cystéine et complété avec de l'acide 5-aminolaevulinique ; 3. La

culture des hépatocytes dans un milieu contenant 2% (v/v) de DMSO ; 4. La culture des hépatocytes dans un milieu contenant 0,5 mM de metyrapone.

Dans le premier système, l'expression de CYP4A1 est augmentée. Ainsi la sous-famille de ce gène (Paine, 1991, 1995) est susceptible de représenter majorité du contenu en CYP450. Dans le deuxième système, l'expression de CYP2A1 est augmentée mais celles des autres isoenzymes P450 du système sont inconnues. Dans le troisième système, CYP2E1 représente la plus grande proportion de tout le contenu en CYP450. Le troisième système n'empêche pas le déclin des formes constitutives mais a plutôt comme conséquence une induction précoce de l'isoforme CYP1A1 induite par les hydrocarbures polycycliques et de l'isoforme CYP3A1 induite par les glucocorticoïdes. Le dernier phénomène est intéressant puisque la sous-famille CYP3A1 représente plus que la moitié de la teneur en CYP450 du foie humain tandis que chez le rat cette forme constitue une proportion mineure. Par conséquent, la culture des hépatocytes de rat avec le metyrapone les a humanisés en ce qui concerne leur profil métabolique du diazépam. Ainsi, dans des hépatocytes de rat cultivés avec le metyrapone, l'oxazepam est produit lors de l'incubation avec du diazépam bien que ce métabolite soit habituellement seulement observé avec des incubations utilisant les hépatocytes humains (Blankson *et al.*, 1991).

En résumé, l'expérience avec des hépatocytes de rat indique que les cultures primaires sont plus utiles que les suspensions d'hépatocytes parce que leur vie plus longue permet aux métabolites mineurs d'être détectés. La connaissance de la gamme des métabolites produits à partir d'une nouvelle entité chimique peut être augmentée en incubant des hépatocytes de rat sous différentes conditions de culture qui changent l'expression des différents cytochromes P450 et cette observation pourrait également être exploitée pour faciliter l'identification des métabolites (Paine, 1996).

Le système d'hépatocytes en culture est donc plus approprié puisqu'il reflète non seulement la phase I et II du métabolisme de biotransformation d'un composé, mais également son transport et son excrétion à travers la membrane plasmique (Bachmann et Ghosh, 2001). Ce système *in vitro* devrait refléter le métabolisme *in vivo*, permettre de détecter les différences inter espèce, et de prévoir la clairance du composé (Wrighton *et al.*, 1995).

Pour les applications biomédicales, la conservation de quantités importantes d'hépatocytes métaboliquement actifs est nécessaire. La découverte des cryoprotectants comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), le 1,2-propanediol, le glycérol a permis la cryoconservation de divers types cellulaires. Plusieurs protocoles ont été proposés pour la cryoconservation des hépatocytes en suspension (Diener *et al.*, 1993; Dou *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1985). Les hépatocytes cryoconservés ont une valeur considérable pour les recherches dans le domaine de l'hépatologie et la pharmacologie: toxicologie (Santone *et al.*, 1989; Zaleski *et al.*, 1993), offrant l'opportunité de répéter des investigations sur des groupes bien définis de cellules. En outre, le développement de dispositifs bioartificiels de foie dépend fortement d'unités fonctionnelles aisément disponibles (Gerlach *et al.*, 1994; Uchino *et al.*, 1991).

## 2.5 LA CRYOCONSERVATION

### 2.5.1 LES PRINCIPES DE LA CRYOCONSERVATION

La cryoconservation permet le ralentissement, voir l'arrêt de toutes les fonctions biologiques. À des températures inférieures à  $-150^{\circ}\text{C}$ , les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont arrêtées : le temps cellulaire est suspendu. À cette température, l'eau, constituant la majeure partie du contenu cellulaire, est sous forme solide. Le problème de la cryoconservation réside donc dans le fait d'atteindre des températures très basses puis de revenir à  $37^{\circ}\text{C}$  sans dommage cellulaire. Lors du réchauffement, le contenu cellulaire doit revenir à un état liquide, et la cellule doit rester fonctionnelle et conserver son intégrité membranaire.

Lors de la congélation, la formation de la glace dans l'environnement extracellulaire des cellules vivantes induit de nombreux changements physiques et chimiques auxquels elles doivent résister afin de rester viables. Les dommages cellulaires sont liés à la nature et à la cinétique de leur réponse à ces conditions (Franks *et al.*, 1983; Mazur, 1965).

Lors du refroidissement, les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire, induisant une augmentation des sels dissous dans ce compartiment et une hypertonicité de celui-ci. Le développement d'un gradient de pression osmotique à travers la membrane cellulaire se produit, l'extérieur ayant une pression osmotique plus élevée que l'intérieur. Ce gradient fournit la force d'entraînement du flux d'eau de l'intérieur des cellules vers le milieu extracellulaire. Plus le milieu refroidi, plus la

glace se forme dans le milieu extracellulaire, et plus la cellule se déshydrate. Si le taux de refroidissement est suffisamment lent, le mouvement de l'eau à travers la membrane maintiendra la cellule près de l'équilibre osmotique avec l'environnement externe. Dans le cas contraire, quand les cellules sont refroidies rapidement, la formation de la glace dans le milieu extracellulaire est beaucoup plus rapide que le flux d'eau de la cellule. Ceci a comme conséquence la formation de glace intracellulaire qui cause des dommages substantiels. La capacité d'une cellule à réagir osmotiquement à son environnement est donc un élément fondamental de sa réponse aux basses températures (Franks *et al.*, 1983; Mazur, 1965; Rasmussen *et al.*, 1975).

En 1963, Mazur a proposé une approche quantitative pour décrire la réponse cellulaire aux basses températures (Mazur, 1963, 1965). Il a proposé que la vitesse du flux d'eau d'une cellule pendant la congélation puisse être prévue si on connaît la perméabilité de la cellule pour l'eau et le ratio de sa superficie par rapport à son volume. En 1972, Mazur *et al.* ont présenté une hypothèse à deux facteurs pour expliquer les différences observées dans les cryo-dommages pendant un refroidissement lent et rapide (Mazur *et al.*, 1972). Le premier dépend de la concentration des corps dissous, donc de l'augmentation de l'osmolarité, dus à la formation de glace extracellulaire. Le deuxième dépend de la formation de glace pendant la congélation ainsi que la recristallisation intracellulaire lors de la décongélation. Donc, selon Mazur et al., le type de dommages cellulaires dépend du taux de refroidissement. Un taux de refroidissement lent expose, sur de longues périodes, les cellules à des concentrations élevées en corps dissous, alors que les taux de refroidissement rapides augmentent la probabilité de la formation de glace intracellulaire (Mazur *et al.*, 1972). Un taux de décongélation lent expose les cellules à des concentrations élevées en sel et augmente la probabilité de recristallisation (Lovelock, 1953b; Mazur *et al.*, 1972). Le développement de cette hypothèse a servi de base à de nombreuses études sur les mécanismes de la réponse cellulaire aux vitesses de refroidissement.

Lors du refroidissement lent, bien que l'équilibre osmotique soit maintenu et que la formation de glace intracellulaire soit évitée, des dommages cellulaires peuvent se produire. Deux mécanismes sont mis en cause lorsque des dommages se produisent pendant le refroidissement lent : la toxicité des corps dissous (Lovelock, 1953a; Mazur *et al.*, 1972), et des dommages dus au rétrécissement cellulaire (Meryman, 1974; Steponkus, 1978). Pendant le refroidissement lent, l'augmentation de la concentration des corps dissous intracellulaires et extracellulaires se produit à cause de la sortie d'eau des cellules et de la formation de la glace externe, respectivement (Mazur, 1963). Le deuxième mécanisme est le rétrécissement cellulaire dû à l'hypertonie intracellulaire. La cellule possède un volume critique minimum qui ne peut être dépassé pendant la congélation (Meryman, 1974). Il est également proposé que la superficie de la cellule soit réduite suite à une perte de matériel membranaire pendant le refroidissement lent (Steponkus, 1978). Certes, la membrane plasmique a une certaine résistance mécanique à l'étirement mais à chaque déshydratation et réhydratation, le volume cellulaire est modifié, générant des stress mécaniques pour la membrane, et une modification trop rapide de la surface cellulaire entraîne des ruptures irréversibles de celle-ci. Les dommages dus au refroidissement lent sont donc le résultat d'événements toxiques et osmotiques liés à l'exposition à une concentration croissante des corps dissous.

## **2.5.2 LES DOMMAGES LIÉS À LA CRYOCONSERVATION**

### **2.5.2.1 FORMATION DE LA GLACE INTRACELLULAIRE**

Lorsque l'eau se transforme en glace, son volume augmente. En effet, la masse volumique de l'eau, minimale vers 4°C, augmente après le changement d'état de la phase liquide vers la phase solide, puis le volume de la glace continue à augmenter quand la température diminue jusqu'à -200°C.

L'eau solide peut exister sous différentes formes que l'on peut regrouper en 5 systèmes cristallins : hexagonal, cubique, rhomboédrique, tétragonal et monoclinique. La transition de phase liquide/solide est induite par la température et la pression. En phase solide, des transitions brutales d'un type cristallin vers un autre peuvent être induites par des variations de pression et de température. Dans les systèmes biologiques, seuls les types hexagonal et cubique sont à considérer (Courstens *et al.*, 1989a; Courstens *et al.*, 1992; Courstens *et al.*, 1989b).

Les cellules sont composées d'une grande proportion d'eau. L'eau intracellulaire peut être sous forme liée ou libre. C'est la forme libre qui va pouvoir être convertie et subir des transformations au cours des étapes de congélation et de décongélation.

La formation de glace intracellulaire (IIF) se produit quand une cellule ne peut pas maintenir l'équilibre avec son environnement externe. Pendant le refroidissement rapide, la formation de la glace et l'augmentation de la concentration des corps dissous extracellulaires se produisent trop rapidement pour que la cellule réponde par osmose. Ceci a comme conséquence que le cytoplasme est refroidi en deçà de son

point de congélation. Lorsqu'un corps est à l'état liquide à une température inférieure à son point de cristallisation, on dit qu'il est en état de surfusion. La surfusion augmente la probabilité de la formation de glace intracellulaire. Cependant, le refroidissement trop rapide n'est pas le seul facteur nécessaire pour l'IIF.

En effet, dans un cytoplasme en état de surfusion, la glace doit être nucléée pour être formée. Alors que la membrane des cellules sert d'inhibiteur efficace pour la croissance de la glace, le cytoplasme, lui, contient peu de substances de nucléation efficaces (Franks *et al.*, 1983; Rasmussen *et al.*, 1975). Le mécanisme par lequel le cytoplasme en état de surfusion devient nucléé a été le sujet de beaucoup de discussion. Il est fort probable que la glace extracellulaire et la membrane plasmique des cellules soient impliquées dans le déclenchement d'IIF. Cependant, l'IIF se produira seulement lorsqu'il y a présence de glace extracellulaire (Mazur, 1965). Les tentatives de nucléer un cytoplasme en état de surfusion en absence de glace extracellulaire ont échouées (Franks *et al.*, 1983; Rasmussen *et al.*, 1975).

Lors du changement de phase, induit par le refroidissement au sein de la cellule, des cristaux de glace se forment. Au fur et à mesure de la descente de température leur volume devient plus important. La formation de la glace intracellulaire crée de nombreux dommages au niveau des organelles cellulaires, mais il semble que les membranes cytoplasmiques ne soient pas endommagées par les cristaux de glace extra et intracellulaires, car le rayon de courbure des cristaux est plus important que le diamètre des plus petits pores membranaires connus. Il est de ce fait probable que la membrane plasmique des cellules intactes sépare toujours la glace intracellulaire de la glace extracellulaire. Les lésions mécaniques sont provoquées par la glace extracellulaire, mais en absence de glace de forme hexagonale, il est rare que la glace extracellulaire transperce les membranes cellulaires (Meryman, 1966a).



Enfin, sous l'influence de variations de température et de pression, des réorganisations de la structure cristalline, qui augmentent le risque de lésions, peuvent survenir. Cependant, les milieux intra et extracellulaires favorisent la formation de cristaux arrondis qui sont peu agressifs. De plus, l'ajout de cryoprotecteurs permet de passer le seuil ( $0^{\circ}\text{C}$  à  $6^{\circ}\text{C}$ ) de la formation de la glace coupante (système hexagonal). Donc, c'est le système de cristallisation en réseaux cubiques qui intervient préférentiellement en dessous de cette température. Ce système arrondit les cristaux par un jeu de croissances / fontes successives. Par conséquent, dans la mesure où les milieux utilisés en cryoconservation ne favorisent pas le type cristallin hexagonal, les seules transitions brutales entre les réseaux cubiques et hexagonaux peuvent se produire uniquement lors du réchauffement (Meryman, 1966a).

#### **2.5.2.2 EFFET SOLUTION**

Dans le cas d'une cellule placée dans une solution isotonique (Figure 2.5 a) les cristaux de glace se forment en premier lieu dans le milieu extracellulaire. La plupart des cellules gèleront intracellulairement entre  $-5$  et  $-15^{\circ}\text{C}$  (Mazur, 1965). Les premiers cristaux sont formés à partir d'eau pure, les sels dissous dans l'eau voient alors leur concentration augmenter et la solution devient hypertonique (Figure 2.5 b). Un appel d'eau se produit, l'eau sort de la cellule par osmose pour rééquilibrer le milieu (Figure 2.5 c). Cette sortie d'eau entraîne la déshydratation de la cellule. C'est ce que l'on appelle l'effet solution.

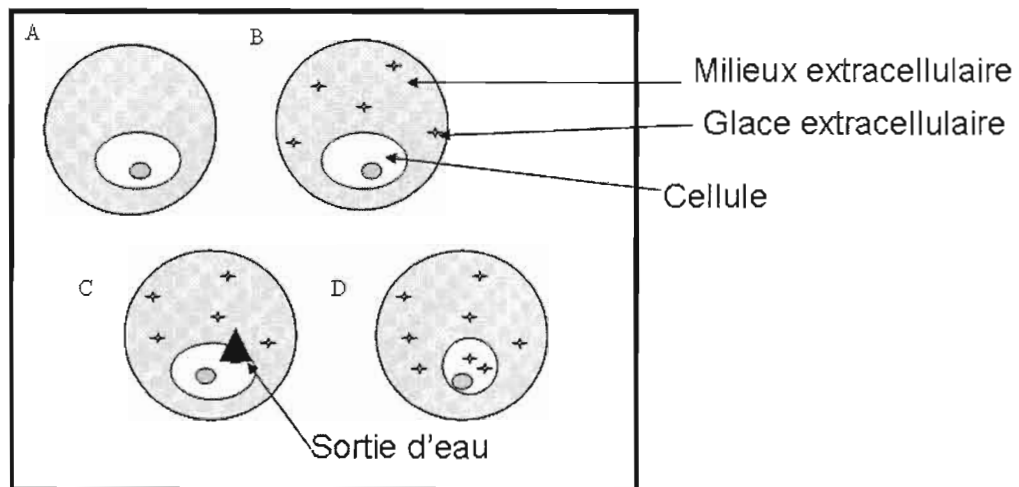


Figure 2.5 Illustration de l'effet solution

L'effet solution peut mener à une toxicité de deux types : 1) la trop forte concentration des solutés intracellulaires pourrait provoquer une toxicité cellulaire (Farrant et Morris, 1973), 2) la déshydratation trop importante, est susceptible d'endommager les membranes (Mazur, 1980).

### **2.5.3 MOYEN PHYSIQUE DE PROTECTION (CONTRÔLE DES CINÉTIQUES DE REFROIDISSEMENT)**

Le contrôle de la cinétique de congélation / décongélation est important. D'une part, il faut limiter la cristallisation intracellulaire. Il est possible de lutter contre ce phénomène en choisissant une technique de refroidissement lent. En effet, si la vitesse est trop rapide, l'eau n'a pas le temps de sortir de la cellule avant de cristalliser.

D'autre part, il faut lutter contre l'effet solution qui entraîne une déshydratation trop intense et néfaste. Il est possible de lutter contre ce phénomène en choisissant une technique de refroidissement rapide.

La difficulté est donc de minimiser l'effet solution en même temps que la formation de glace intracellulaire. Pour cela, on utilise une vitesse de refroidissement lente dans un premier temps, favorisant ainsi la déshydratation de la cellule et la cristallisation extracellulaire puis une vitesse de refroidissement rapide.

La congélation lente, comme son nom l'indique, est une technique de cryoconservation retardée dont le principe est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux. Elle est d'ailleurs aussi appelée congélation « à l'équilibre ». Les cryoprotecteurs utilisés sont le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO ou encore le propane-diol, à la concentration de 10 % environ, ce qui équivaut à 1-1,5 M. L'incorporation des cryoprotecteurs a tendance à se faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes. La cristallisation doit être induite par l'opérateur avant qu'elle ne se fasse de manière spontanée afin d'éviter une congélation des cellules à une température trop basse, ce

qui entraînerait une hausse brutale de la température (pic de surfusion (figure 2.7)) et par conséquent des dégâts cellulaires (figure 2.7). Dans le cas des hépatocytes cryoconservés, avec la technique classique au DMSO, le pic de surfusion se produit à  $-10^{\circ}\text{C}$ . La température de la suspension cellulaire peut remonter jusqu'à  $10^{\circ}\text{C}$  durant le pic de surfusion.

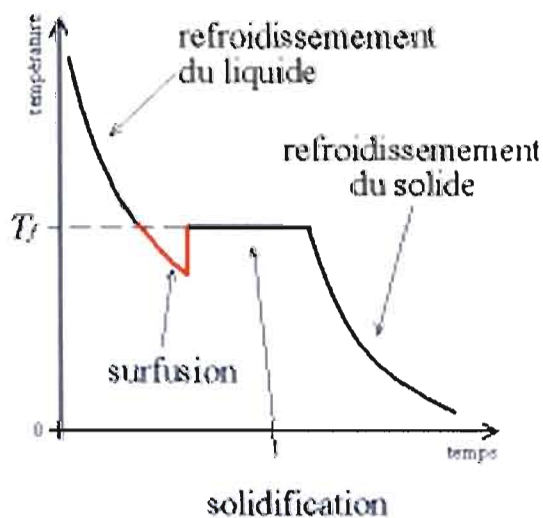


Figure 2.6 Graphique démontrant le pic de surfusion (Wikipedia).  $T_f$  : température de fusion d'équilibre

La température de cristallisation (« seeding ») dépend du point de congélation de la solution, donc elle peut varier en fonction des cryoprotecteurs utilisés ( $-6^{\circ}$  à  $-7^{\circ}\text{C}$ ). La cristallisation est induite avant qu'elle ne se produise de manière spontanée. Ainsi, la zone de surfusion reste constante. La température d'induction est inférieure de quelques degrés à la température de cristallisation (Legrand, 1997).

#### **2.5.4 LES MOYENS CHIMIQUES DE PROTECTION : LES CRYOPROTECTEURS**

Les cryoprotecteurs sont indispensables lors de la congélation quelques soient les courbes de refroidissement. Tous les cryoprotecteurs ne pénètrent pas dans les cellules. Il est d'usage de les séparer en cryoprotecteurs non diffusants (la plupart des sucres ajoutés) et diffusants (le glycérol, l'éthylène glycol, par exemple) (Pegg et Diaper, 1988).

##### **2.5.4.1 LES CRYOPROTECTEURS DIFFUSANTS**

Tout comme l'eau, les cryoprotecteurs diffusants ne traversent pas les membranes immédiatement. Leur diffusion dans et hors des cellules est régie par des paramètres de diffusion propres au cryoprotecteur et au type cellulaire pour une espèce déterminée. Comme pour l'eau, leur passage est contrôlé par les différences de concentrations entre milieu intra et extra cellulaire (Pegg et Diaper, 1988). Il est également modifié par la viscosité du cryoprotecteur et la température.

Les cryoprotecteurs diffusants sont généralement des alcools de faible poids moléculaire tel le glycérol, l'éthylène glycol, le 1,2-propanediol et le DMSO (diméthylsulfoxyde). Ils vont se substituer à une partie de l'eau intracellulaire et permettre ainsi une déshydratation partielle des cellules en plus de limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire. Ils réduisent également la vitesse de croissance de ces cristaux, abaissent la température de solidification de l'eau intracellulaire, tel un « antigel », et modifient la forme des cristaux de glace (Hey et MacFarlane, 1998; Meryman, 1966b; Palasz et Mapletoft, 1996).

Cependant, le principal facteur limitant l'utilisation de ces cryoprotecteurs est leur toxicité. Il est possible de distinguer deux types de toxicité. Une toxicité osmotique d'une part et une toxicité biochimique d'autre part.

La toxicité osmotique se manifeste lors de l'ajout et du retrait du cryoprotecteur. En effet, le cryoprotecteur a une osmolarité plus élevée que le milieu intracellulaire. Par un phénomène d'osmose, de l'eau va sortir des cellules pour ré-équilibrer l'osmolarité du milieu. On s'attend ensuite à ce que le cryoprotecteur pénètre dans les cellules mais ces dernières sont beaucoup plus perméables à l'eau qu'au cryoprotecteur. Il pénètre donc plus difficilement, plus lentement. La cellule reste contractée jusqu'à ce que le flux de sortie d'eau soit contrebalancé par une entrée du cryoprotecteur souvent accompagné d'une entrée d'eau (Meryman, 1966b).

Cette toxicité osmotique peut également se manifester après la décongélation, lors du retrait des cryoprotecteurs. La cellule ayant incorporé un cryoprotecteur puis placé dans un milieu privé de cryoprotecteur voit son volume augmenter par une entrée massive d'eau, pouvant aller jusqu'à l'éclatement (Meryman, 1966b).

La toxicité biochimique des cryoprotecteurs pourrait résulter des interactions entre le cryoprotecteur et les protéines membranaires, enzymatiques et cytosquelettiques ainsi qu'avec les microfilaments et les microtubules. Il est possible de réduire la toxicité biochimique en minimisant le temps de contact avec le cryoprotecteur.

#### 2.5.4.2 LES CRYOPROTECTEURS NON PERMÉABLES

Les cryoprotecteurs sont également des composés organiques qui ne peuvent pas pénétrer dans les cellules, tels que les petits saccharides comme le saccharose, le galactose ou encore le tréhalose. Ils ont un rôle osmotique très important, notamment lors du réchauffement, en favorisant la sortie des cryoprotecteurs perméables. Ils maintiennent une osmolarité élevée dans le milieu extracellulaire, ils évitent ainsi une entrée massive d'eau dans les cellules lors de la décongélation (Meryman, 1966b).

Il existe aussi d'autres cryoprotecteurs non perméables de haut poids moléculaire tel le sérum de veau fœtal (FVS), le polyvinylpyrrolidone (PVP), l'albumine sérique bovine (BSA), le ficoll (polymère de saccharose) et d'autres polymères. Ils protègent aussi au cours de la congélation et de la décongélation en réduisant la taille des cristaux de glace et en induisant des formes de cristaux moins traumatisantes. Ils permettent, *via* l'augmentation de la viscosité du milieu, la diminution de la rapidité des mouvements de l'eau et de chocs osmotiques importants. De plus, ils permettent, *via* l'augmentation de la pression osmotique, la réduction de la quantité de cryoprotecteurs pénétrants nécessaires à une bonne cryoconservation (Meryman, 1966b). Donc, les cryoprotecteurs non perméables sont la plupart du temps utilisés en combinaison avec des cryoprotecteurs perméables pour augmenter le potentiel cryoprotecteur de ces derniers.

### 2.5.4.3 CRYOPROTECTEUR DE NOUVELLE GÉNÉRATION

#### 2.5.4.3.1 PROTÉINES ANTIGEL OU « ANTI-FREEZE PROTEINS (AFP) »

Les protéines antigel (AFP) ont été mises en évidence chez des poissons de l'Antarctique et de l'Atlantique nord, pouvant survivre dans des eaux de température inférieure à 0°C. Elles sont retrouvées dans le fluide circulant du poisson, en grande quantité lors de périodes où la température de l'eau est très basse (Tomczak *et al.*, 2001).

On distingue 4 types d'AFP (Davies et Hew, 1990) :

- AFGP (« anti-freeze glycoProtein »), isolée dans un poisson de l'Antarctique (notothenioids) et chez la morue arctique, est une glycoprotéine présentant la répétition d'un glycopeptide (Ala-Ala-Thr avec des résidus glucidiques fixés sur la thréonine).
- AFP de type I, isolée de *Pseudopleuronectes americanus*, un poisson plat de l'Atlantique nord, est riche en alanine. C'est la première AFP documentée et dont la structure 3D fut déterminée. Le type I se compose d'une simple et longue hélice alpha amphipathique (Duman et DeVries, 1972).
- AFP de type II, fut isolée dans *Hemirhamphys americanus*, un poisson vivant dans les fonds marins de l'Atlantique nord. Elle est retrouvée aussi chez l'éperlan et le hareng de mer. Ce sont des protéines globulaires riches en cystéine et contenant cinq ponts disulfures (Ng et Hew, 1992).



- AFP de type III, fut isolée de *Macrozoarces americanus*, un poisson de l'Atlantique nord. Elle démontre la même structure hydrophobe que l'AFP de type I. (Crevel *et al.*, 2002).

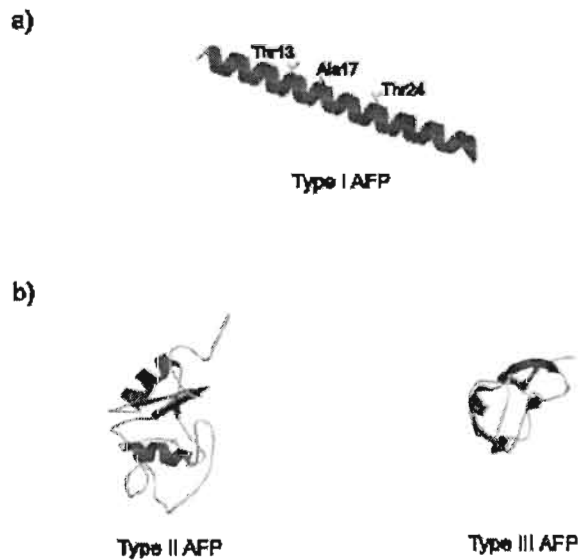


Figure 2.7 Structure 3D des AFPs (Graether *et al.*, 1999)

Le mode d'action et l'efficacité de ces protéines comme antigels ne sont pas totalement élucidés.

Les protéines antigels (AFP) sont un groupe de protéines hétérogènes. Ces protéines possèdent la propriété de maintenir l'état de surfusion en inhibant la croissance normale de la glace (Davies et Hew, 1990; Raymond et DeVries, 1977; Yang *et al.*, 1988). Cette propriété est indépendante de l'origine des AFPs. Ces protéines ont la

capacité de modifier la structure du cristal de glace (Raymond et DeVries, 1977) et d'inhiber la recristallisation de la glace (Knight *et al.*, 1988). De plus, tel que proposé par Rubinsky ces protéines peuvent servir de cryoprotecteurs pour les membranes plasmiques (Rubinsky *et al.*, 1991). Les AFPs possèdent donc la capacité de protéger la membrane plasmique des cellules contre des dommages induits par l'hypothermie, bien que cette propriété semble dépendre du type d'AFP et de sa quantité. Cependant, plusieurs investigateurs décrivent des effets toxiques dus aux AFPs (Tomczak *et al.*, 2001; Wang, 2000).

L'inhibition de la recristallisation de la glace est la capacité des AFPs à limiter la croissance des cristaux de glace à des températures inférieures à zéro (Knight *et al.*, 1984), d'où l'appellation protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace (IRIP). Des IRIPs ont été retrouvées dans une grande variété d'organismes qui doivent se protéger contre des dommages causés par le gel, y compris plusieurs plantes (telles que l'avoine, le seigle, l'orge, le blé, la carotte et la pomme de terre), des insectes, des poissons, des mycètes et des bactéries (Crevel *et al.*, 2002; Doucet *et al.*, 2002). Les conditions qui favorisent la recristallisation de la glace se produisent chez les plantes durant la fluctuation des températures journalières de l'hiver et pendant le dégel au printemps. En empêchant cette recristallisation de glace, les IRIPs peuvent contribuer à la survie des plantes pendant la période de gel et le dégel (Sidebottom *et al.*, 2000; Smallwood *et al.*, 1999).

### 2.5.4.3.2 LE BLÉ D'HIVER

Le froid est un facteur important qui limite la distribution des espèces végétales sauvages. La baisse de productivité des cultures suite aux gelées soudaines d'automne ou à des températures inhabituellement basses en hiver est considérable. Les plantes doivent être capables d'appréhender les fluctuations transitoires aussi bien que les changements saisonniers de température et répondre à ces changements en ajustant activement leur métabolisme (Fowler *et al.*, 1999; Huner *et al.*, 1998; Varapetian et Jackson, 1997). L'exposition des plantes aux basses températures produit des changements morphologiques, biochimiques, et physiologiques qui souvent sont fortement corrélés avec la tolérance au froid de la plante et sa survie à l'hiver (figure 2.8). Des changements aux niveaux des membranes, et des modifications des osmoprotecteurs, des sucres, des antioxydants et des protéines sont observés dans les plantes subissant un stress de températures (Breton *et al.*, 2000).

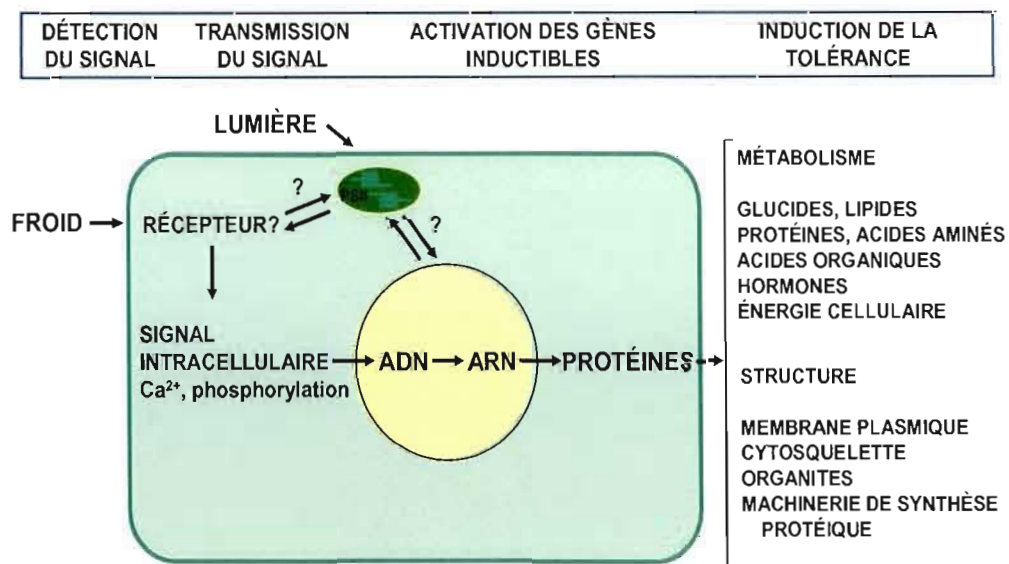


Figure 2.8 Schéma de la réponse au stress du froid chez les plantes (Ouellet, 2002)

Quand des plantes sont exposées aux stress abiotiques tels que les basses températures, la fluidité des membranes est perturbée (Nishida et Murata, 1996). Des modifications importantes dans la composition en lipides des membranes sont induites par les basses températures. Les plantes modifient les types de lipide et leur degré de saturation pour préserver la fluidité membranaire et pour empêcher les dommages membranaires induits par le gel (Nishida et Murata, 1996; Uemura et Steponkus, 1994). Des études ont démontré une insaturation plus élevée des phospholipides dans les membranes cellulaires des plantes acclimatées au froid (Harwood *et al.*, 1994; Lynch et Steponkus, 1987; Uemura et Steponkus, 1994; Zhou *et al.*, 1994).

De plus, lorsque les plantes sont soumises aux stress thermiques, une augmentation de la concentration des corps dissous intracellulaires est observée. Les plantes réagissent à ces stress en induisant diverses réponses dont la synthèse d'osmoprotecteurs et de sucres pour conserver leur osmolarité (Guy, 1990).

Les osmoprotecteurs (également nommé corps dissous compatibles) sont produits par tous les organismes (McNeil *et al.*, 1999; Yancey *et al.*, 1982). Ce sont des composés fortement solubles, neutres au pH physiologique et non-toxiques à fortes concentrations. Plusieurs osmoprotecteurs dérivés d'acides aminés ont été identifiés dans les plantes, en condition de stress ; tels la proline (Bertrand et Paquin, 1991; Delauney et Verma, 1993; Hare *et al.*, 1999; Murelli *et al.*, 1995; Naidu *et al.*, 1991; Wanner et Junttila, 1999), le 3-diméthylsulfoniopropionate (McNeil *et al.*, 1999), les polyamines (Bouchereau *et al.*, 1999; Kumar et Minocha, 1998), le trigonelline (Tramontano et Jouve, 1997) et les bêtaïnes (McNeil *et al.*, 1999; Naidu *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1995; Nuccio *et al.*, 1999). Bien qu'il y ait plusieurs exemples d'osmoprotecteurs dérivés des acides aminés, les études ont surtout porté sur l'accumulation croissante de proline et de bêtaïne (Holmberg et Bülow, 1998; McNeil *et al.*, 1999).

L'acclimatation au froid provoque également une augmentation du contenu en sucres chez plusieurs espèces (Chen et Li, 1982; Perras et Sarhan, 1984; Siminovitch et Cloutier, 1982; Trunova, 1982). L'accumulation de sucres tels que le saccharose, raffinose, sorbitol et des fructans pendant l'acclimatation des plantes au froid a été observée à plusieurs reprises (Antikainen et Pihakaski, 1994; Bachmann *et al.*, 1994; Mitchell et Madore, 1992; Pollock *et al.*, 1988). Perras et Sarhan ont démontré que durant l'acclimatation au froid, les contenus en sucres solubles, sucres réducteurs et ATP étaient plus élevés chez le blé d'hiver (plus tolérant au gel) que chez le blé de printemps (Perras et Sarhan, 1984). Plusieurs de ces composés sont censés stabiliser les membranes et les protéines durant l'acclimatation au froid (Guy, 1990). L'accumulation des sucres et d'ATP, qui sont des composés énergétiques, démontre que le blé d'hiver possède un statut énergétique plus élevé que son homologue de printemps. Ceci pourrait permettre la synthèse de substances protectrices de nature protéique, glycoprotéique ou lipidique qui augmenteraient la tolérance des membranes au gel. De plus, l'accroissement de la concentration en sucres participe avec d'autres composés à l'augmentation de l'osmolarité intracellulaire, ce qui abaisse le point de congélation et protège ainsi la cellule végétale contre le gel intracellulaire (Cadieux *et al.*, 1988). Les polyols tels que le mannitol (Shen *et al.*, 1997; Tarczynski *et al.*, 1993; Tarczynski *et al.*, 1992), le D-ononitol (Sheveleva *et al.*, 1997; Vernon *et al.*, 1993), l'inositol (Smart et Flores, 1997) et le sorbitol (Sheveleva *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 1995) sont une autre classe de composés avec des activités osmoprotectives. Ces alcools dérivant de sucres sont étroitement liés aux sucres et pourraient imiter la structure de l'eau, maintenant une sphère artificielle d'hydratation autour des macromolécules (Bartels et Nelson, 1994; Stoop *et al.*, 1996).

Par ailleurs, lors des stress environnementaux, les plantes augmentent la synthèse des antioxydants tels que le glutathion (GSH) et les vitamines C (ascorbate) et E ( $\alpha$ -tocophérol), ainsi que des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase

(SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), l'ascorbate peroxydase (APX) et la catalase (Noctor et Foyer, 1998).

Lors de l'acclimatation au froid, des protéines de tolérance au gel sont aussi produites. Une augmentation marquée du contenu en protéines a été observée lors de l'acclimatation au froid chez plusieurs espèces possédant la capacité de développer une tolérance au gel (Guy, 1990; Hughes et Dunn, 1996; Thornashow, 1990). Dans plusieurs cas, ces protéines s'accumulaient à des niveaux plus élevés chez les variétés tolérantes que chez les variétés sensibles au gel, suggérant que ces protéines pourraient être impliquées dans le développement de la tolérance au gel.

#### **2.5.4.3.3 LES PROTÉINES DE TOLÉRANCE AU GEL OU « FREEZING TOLERANCE ASSOCIATED PROTEINS » (FTPS)**

Contrairement aux organismes animaux, les plantes ne peuvent se déplacer, par conséquent, elles doivent sans cesse s'adapter aux conditions de température et d'humidité imposées par leur environnement. En général, le froid inhibe le développement des plantes, tant la germination, que la floraison ou la formation des fruits. Cependant certaines plantes ont développé des mécanismes leur permettant d'acquérir une tolérance accrue au froid.

L'acclimatation au froid se divise en 2 phases, d'abord l'adaptation des plantes aux basses températures, puis l'acquisition de la tolérance au gel. L'acclimatation au froid provoque plusieurs modifications biochimiques et physiologiques. Ces modifications résultent de changements dans l'expression de certains gènes. Depuis quelques années, dans diverses espèces végétales, plusieurs gènes qui s'activeraient quand la température baisse ont été isolés.

Plusieurs protéines végétales accumulées lors de l'acclimatation au froid ont été découvertes au laboratoire du Dr. Fathey Sarhan. Parmi ces protéines on compte les WCS (wheat cold specific proteins ou protéines de blé spécifique au froid), les WCOR (wheat cold regulated protéines ou protéines de blé régulées par le froid), les LEA-3 (Late embryogenesis abundant protein, group 3 ou Protéine abondante d'embryogenèse tardive) et TaTIL (*Triticum aestivum* temperature induced lipocaline ou lipocaline induite par la température chez *Triticum aestivum*)

#### 2.5.4.3.3.1 LES DÉHYDRINES

Les protéines WCS120 et WCOR410 s'accumulent significativement chez le blé lors de l'acclimatation au froid et la déshydratation. Ce sont deux protéines très hydrophiles (Danyluk *et al.*, 1998; Houde *et al.*, 1995). Cependant, leur localisation subcellulaire diffère. La WCS120 est une protéine cytoplasmique et nucléaire (Houde *et al.*, 1995) et la WCOR410, est une protéine associée à la membrane de façon périphérique (Danyluk *et al.*, 1998). Par ailleurs, elles semblent avoir des modes d'action différents.

Le mode d'action proposé pour la WCS120 est d'entourer les protéines cellulaires essentielles et de les protéger contre le changement de conformation ou l'agglomération pendant la congélation ou la déshydratation (Houde *et al.*, 1995). Un mode d'action similaire a été proposé pour le rôle cryoprotecteur du BSA dans la cryoprotection des enzymes pendant l'entreposage à basse température (Tamiya *et al.*, 1985). La présence élevée de WCS120 dans le noyau des cellules indique que cette protéine peut être importante pour la protection de la machinerie transcriptionnelle. La protéine WCS120 est très hydrophile, ce qui lui permettrait de fournir un microenvironnement aux protéines et ainsi réduire la dénaturation résultant de la perte

de molécules d'eau (Jaenicke, 1991). L'effet cryoprotecteur de ces protéines peut être lié à l'accumulation au niveau des tissus vasculaires pendant l'acclimatation au froid. La présence dans ces tissus peut jouer un rôle important pour la survie de cette région critique requise pour la reprise de croissance (Houde *et al.*, 1995).

Les propriétés, l'abondance et la localisation de la WCOR410 suggèrent qu'elle soit impliquée dans la cryoprotection de la membrane plasmique durant la congélation (Danyluk *et al.*, 1998). Il a été proposé que la WCOR410 joue un rôle en empêchant la déstabilisation de la membrane plasmique qui se produit pendant les conditions de déshydratation liées à la congélation, et pourrait être un facteur déterminant pour la résistance des cellules à la congélation. En outre, les protéines telles que la WCOR410 contiennent une teneur élevée en acides aminés acides, basiques et hydroxylés, qui peuvent interagir avec des lipides membranaires, tels que les différents phospholipides, les cébrosides et les stérols. Si une molécule de WCOR410 peut se lier à plusieurs espèces de lipides en même temps, ceci pourrait servir de base pour empêcher la désorganisation lipidique qui se produit pendant la déshydratation. Les déhydrines acides telle que la WCOR410 pourrait aussi être impliquées dans la conservation de l'eau ou directement remplacer l'eau pour la solvation de la membrane (Danyluk *et al.*, 1998).



#### **2.5.4.3.3.2 PROTÉINES ABONDANTES TARDIVES DE L'EMBRYOGENÈSE DU GROUPE 3 OU « LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN, GROUP 3 »**

Une autre classe de protéines présentes sont les protéines LEA3-like qui peuvent être classifiées en tant que petites (groupes LEA3-L1 et LEA3-L2) et grandes (protéines de groupe LEA3-L3). Ces protéines possèdent un peptide signal pour les chloroplastes ou les mitochondries. Les protéines LEA3-like sont donc prévues pour être transloquées dans les organelles. Ainsi, cela suppose que leurs propriétés et leurs fonctions aient pu évoluer pour fonctionner dans un environnement spécifique aux organelles. Dans des conditions de stress, il est important de protéger les chloroplastes et les mitochondries pour maintenir la production énergétique cellulaire. Ainsi, ces groupes de protéines peuvent être très importants pour la survie cellulaire lors de stress.

Pour déterminer son implication dans la tolérance au gel, la WCS19 (LEA-3L2) a été constitutivement exprimée chez *Arabidopsis*. L'augmentation de la tolérance au gel des plantes transgéniques acclimatées au froid est statistiquement significative. L'expression constitutive de la protéine WCS19 chez *Arabidopsis* protège les feuilles des plantes transgéniques acclimatées au froid contre les dommages induits par le gel. Bien que l'on ait observé une activité cryoprotective de la WCS19 chez le blé, son mode d'action n'est pas encore connu. Elle pourrait interagir avec des lipides ou des protéines spécifiques dans la membrane ou le stroma des chloroplastes (N'Dong *et al.*, 2002).

### 2.5.4.3.3 LES LIPOCALINES

Une autre FTP présente chez le blé est *TaTIL*, une lipocaline. Les lipocalines font partie d'une grande famille diversifiée de petites protéines extracellulaires. Elles se retrouvent chez les vertébrés, les animaux, les plantes et les bactéries invertébrés. Elles sont caractérisées par une cavité centrale hydrophobe, appelée barrique- $\beta$ , qui leur donne la capacité de lier des molécules hydrophobes. La liste des ligands potentiels s'accroît constamment et inclut des molécules diverses telles que les stéroïdes, les phéromones et les molécules odorantes. Les lipocalines ont été classées comme protéines de transport, mais il devient évident que certaines d'entre elles peuvent également être impliqués dans plusieurs fonctions importantes tels que : la modulation de la croissance cellulaire et du métabolisme, la liaison aux récepteurs de surface, la régénération, la régulation de la réponse immune, l'olfaction, la biogénèse et la réparation des membranes, l'induction de l'apoptose, le comportement animal et la réponse au stress environnemental (Akerstrom *et al.*, 2000; Bishop, 2000; Frenette Charron *et al.*, 2002).

Les lipocalines du blé (*TaTIL*) sont associées à la membrane plasmique mais ne contiennent pas de peptide de signal. Des analyses bioinformatiques ont suggéré la présence d'un site de clivage en C-terminal et d'un environnement favorable pour l'addition d'une ancre de type glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les lipocalines de plantes sont spécifique à certains tissus et leur accumulation en réponse au stress induit par les températures suggèrent un rôle possible de protection contre des dommages dus au stress. Leur localisation dans les feuilles soutient l'idée que ces protéines peuvent agir en éliminant des molécules potentiellement nocives connues pour être induites par le stress thermique et l'excès de lumière (Frenette Charron *et al.*, 2002). *TaTIL* pourrait avoir un rôle d'antioxydant ou pourrait également être impliquée dans le transport de stérols à la membrane en réponse au stress (Demel et De Kruffy, 1976).

## **CHAPITRE III**

### **PRÉSENTATION DE LA MÉTHODOLOGIE EN REGARD DES OBJECTIFS DE RECHERCHE**

### **3.1 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE BLÉ**

La première partie de nos recherches porte sur l'évaluation du potentiel cryoprotecteur d'un extrait brut de blé d'hiver (WPE).

#### **3.1.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITIONS DE CROISSANCE**

Le blé d'hiver *Triticum aestivum* L., cv Clair, possédant une LT50 de -19°C (température à laquelle 50% des plants ne survivent pas) est utilisé dans cette étude. Des plants de blé sont cultivés et traités comme décrit précédemment (Danyluk *et al.*, 1998). Brièvement, les plantes sont cultivées pendant 10 jours à 20°C (NA). L'acclimatation du blé (CA) est ensuite effectuée à 4°C pendant une période de sept ou trente-cinq jours.

#### **3.1.2 EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES**

Les parties aériennes de jeunes plantes est coupées et broyées dans l'eau ultrapure (3ml d'eau par gramme de poids frais de blé) à 4°C jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. L'homogénat est filtré à l'aide de trois épaisseurs de miracloth puis centrifugé à 30,000g pendant 45 minutes à 4°C. Le pH du surnageant est ajusté à 7.4, puis stérilisé à l'aide d'un filtre de 0.22 micron.

L'extrait est dialysé contre de l'eau ultrapure, à l'aide de membrane de 12-14 000 MWCO (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) avant d'être

concentré par lyophilisation puis conservé à -20°C. L'extrait est resuspendu dans le milieu de culture à 4°C avant d'être ajouté à la suspension d'hépatocytes.

### **3.1.3 PURIFICATION DE L'EXTRAIT DE BLÉ**

La seconde partie de nos recherches porte sur la détermination de la nature de la fraction active du WPE.

Afin d'enrichir les extraits en protéines, l'extrait brut est partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium (0-20 %, 21-40%, 41-60%, 61-80% et 81-100%) ou à l'acétone (55%). Une précipitation d'une heure est suivie d'une dialyse, contre de l'eau ultrapure, de 12 heures. Les extraits purifiés au sulfate (SulWPE) et à l'acétone (AcWPE) sont ensuite stérilisés sur un filtre 0.22 micron, puis concentré par lyophilisation.

Un échantillon (75 mg de protéines) de l'extrait SulWPE NA et CA est ensuite purifiée par des méthodes chromatographiques : exclusion sur gel (sephacryl S200) et chromatographie d'affinité sur Concanavaline A.

De plus, une partie de l'extrait brut WPE est bouillie afin de dénaturer les protéines. Cette fraction riche en polysaccharides, est également testée afin de déterminer l'importance des polysaccharides contenus dans l'extrait végétal.

### **3.1.4 PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES**

La troisième partie de nos recherches porte sur l'évaluation du potentiel cryoprotecteur des protéines de tolérance au gel du blé (WFTP).

Cinq clones cDNA (WCS120, WCS19, WCOR410, TaTIL et TaIRI2) sont exprimés dans le vecteur pTrcHis dans la bactérie *E. coli*. Les bactéries sont cultivées dans le milieu LB supplémenté avec de l'ampicilline (10 mg/ml) pendant 3 heures à 37°C sous agitation de 200 rpm. Ces cultures sont ensuite induites avec 1mM d'isopropyl  $\beta$ -1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 3 heures à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Les protéines recombinantes sont purifiées sur une résine His-tag selon les recommandations du manufacturier (Novagen/EMD, CA).

## **3.2 PRÉPARATION DES CELLULES D'HÉPATOCYTES DE RAT**

### **3.2.1 ISOLATION ET CULTURE DES HÉPATOCYTES**

Les hépatocytes sont isolés du foie de rats, mâles Sprague-Dawley (120-180 g) (Charles River Canada, Saint-Constant, Que), par une technique, en deux étapes, de digestion à la collagénase (Guillemette *et al.*, 1993; Seglen, 1976). Les animaux sont soignés et manipulés selon les directives du Conseil canadien sur les soins et l'usage des animaux de laboratoire (Olfert *et al.*, 1993).

La viabilité des cellules fraîchement isolées est évaluée par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON) avec 2  $\mu$ M d'iodure de propidium (PI) (Reader *et al.*, 1993).

Les hépatocytes fraîchement isolés sont dilués à  $3.5 \times 10^5$  cellules/mL avec du milieu de culture WME complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), d'insuline (0.2 mg/mL), et de la gentamicine (50 mg/mL) puis mis en culture dans des Pétris (Corning, Acton, MA) sous atmosphère humidifiée de 5% CO<sub>2</sub> et 95% air à 37°C. Après 3 h, le milieu est remplacé par du milieu L15 complémenté avec insuline (0.2 mg/mL) et gentamicine (50 mg/mL) puis les cellules sont réincubées durant 14 heures (Reader *et al.*, 1993).

### **3.2.2 CRYOCONSERVATION DES HÉPATOCYTES ET LIGNÉES CELLULAIRES**

Après isolement,  $1.5 \times 10^6$ /mL d'hépatocytes en suspension sont ajoutés au milieu de culture WME complémenté avec 10% de SVF et 20 mg de NA ou CA WPEs dans des cryovials froids. Les lignées cellulaires suivantes sont cryoconservées dans leur milieu respectif supplémenté de 20 mg de NA WPE : A549 (carcinome pulmonaire humain), Caco-2 (adénocarcinome colorectal humain), CHO-B1 (cancer d'ovaire de hamster chinois transfecté avec l'ADNc de la TGF- $\beta$ 1), HeLa (cancer du col de l'utérus de **Henrietta Lacks**), HIEC (cellules d'épithélium intestinal humain), et Jurkat (leucémie humaine de cellules T).

Les témoins positifs sont composés de milieu de culture WME complémenté avec 15% DMSO et 50% SVF. Les témoins négatifs sont composés de milieu de culture WME non supplémenté. Les cryovials contenant les cellules sont congelés à un taux

de refroidissement de 1°C/min dans un récipient de congélation (Nalgene, Rochester, NY) à -80°C pour 24 heures, et puis transférés dans l'azote liquide.

### **3.2.3 DÉCONGÉLATION DES CELLULES**

Les cellules cryoconservées sont décongelées rapidement par agitation douce dans un bain d'eau à 37°C et la viabilité est déterminée comme précédemment.

Pour les tests d'adhésion et les analyses métaboliques, la suspension d'hépatocytes est diluée 10 fois avec du milieu froid, juste après le dégel. Lorsque la viabilité est inférieure à 80%, les cellules mortes sont enlevées par une étape de centrifugation dans 30% de Percoll. Après centrifugation (4°C, 50g, 2 minutes), les hépatocytes sont resuspendus dans 10 ml de WME et lavés deux fois.

Les hépatocytes sont mis en culture dans des Pétris ou des plaques avec du WME complémenté avec de l'insuline (0.2 mg/mL) et gentamicine (50 mg/mL), dans une atmosphère humidifiée avec 5% CO<sub>2</sub> et 95% air à 37°C. Après 3 h, le milieu est changé et les cellules sont incubées durant la nuit dans le milieu L-15 (Reader *et al.*, 1993) complémenté d'insuline et de gentamicine.

Le potentiel cryoprotecteur est évalué par plusieurs tests : viabilité après dégel, viabilité en culture, efficacité d'adhésion et évaluation des fonctions hépatospécifiques (sécrétion d'albumine, métabolisme de l'ammonium en urée, activité basale et inductibilité du cytochrome P-450).



### **3.2.4 TEST DE VIABILITÉ**

#### **3.2.4.1 TEST DE VIABILITÉ LIVE-DEAD**

Après un cycle de congélation et de décongélation, la suspension cellulaire est marquée immédiatement avec des sondes fluorescentes (4  $\mu$ M calcéine et 2  $\mu$ M PI) pendant 5 min et analysée par cytométrie en flux (excitation à 488 nm) avec un FACScan (Becton Dickinson). Le nombre de cellules viables exprimant la fluorescence verte de la calcéine et de cellules mortes exprimant la fluorescence rouge du PI est déterminé avec le logiciel Cell Quest (Becton Dickinson).

#### **3.2.4.2 TEST DE LA LACTATE DÉHYDROGÉNASE (LDH)**

La LDH est déterminée directement dans le milieu de culture. La mesure de l'activité de la LDH est un indice de la détérioration de la viabilité des cellules (Moldeus *et al.*, 1978). Le milieu de culture est recueilli chaque jour et l'activité de la LDH dans le milieu de culture est quantifiée. Les cellules viables sont lysées avec 10% de Triton X-100 à la fin de l'expérience et la LDH est quantifié pour déterminer le nombre de cellules totales (Moffatt *et al.*, 1996).

#### **3.2.4.3 EFFICACITÉ D'ADHÉSION**

L'efficacité d'adhésion est déterminée par la mesure de la LDH des cellules avant mise en culture et après 3 h et 24 h de culture. L'efficacité d'adhésion est définie par

l'activité de la LDH dans une culture de 24 h divisée par l'activité de la LDH avant la mise en culture.

#### **3.2.4.4 ADHÉSION ET MORPHOLOGIE CELLULAIRE**

L'adhésion et la morphologie des hépatocytes ( $2.5 \times 10^5$  cellules) sur des Pétris enduit avec du collagène sont évaluées par microscopie confocale. Le microscope confocal MRC1024 (BioRad, Microscience, Cambridge, MA) est équipé avec un laser à argon (excitation à 488 nm) combiné avec un microscope inversé Eclipse Model TE 3000 (Nikon, Montréal, Que) avec un objectif de 40X Hoffman.

#### **3.2.4.5 IMMUNOFLUORESCENCE DES MOLÉCULES D'ADHÉSION**

Pour l'immunofluorescence, les hépatocytes ( $2.5 \times 10^5$  cellules/mL) sont mis en culture dans des plaques de 12 puits dans du WME supplémenté avec de l'insuline et de la gentamicine. Après 24h en culture, les cellules sont fixées avec 3% de formaldéhyde frais dans le PBS durant 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à 4°C. Les cellules sont perméabilisées avec 0.05% de saponine durant 30 min à 4°C, quenchées avec de la glycine (100mM) durant 45 min à 4°C et ensuite bloquées avec 3% de BSA dans du PBS-T durant 60 min à 4°C.

Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (anti-intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine ou  $\beta$ -caténine (dilution 1/500)) dans du PBS-T avec 2% de BSA durant 60

min à 4°C, lavées 3 fois durant 10 min avec PBS-T à la température de la pièce (TP), puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-IgG couplé à la FITC, dilution 1/500) dans le PBS-T avec 2% de BSA durant 60 min à 4°C et finalement lavées 3 fois avec du PBS-T à TP. Les observations sont effectuées avec un microscope confocal MRC1024 (BioRad, Microscience, Cambridge, MA).

### **3.2.4.6 EXPRESSION PROTÉIQUE DES MOLÉCULES D'ADHÉSION**

L'expression protéique de l'intégrine  $\beta 1$ , la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine est déterminée après 24 h de mise en culture. Les cellules ( $2,5 \times 10^5$  cellules/ Pétris) sont lavées avec du PBS, lysées avec 100  $\mu$ L de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 6 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) et homogénéisées par sonication. Les protéines (40 $\mu$ g) sont séparées sur un gel de polyacrylamide à 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) et ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF). Les membranes sont bloquées dans du TBS-T avec 5% de lait (2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween) et ensuite incubées avec l'anticorps primaire (1/500). Les bandes de protéines sont détectées par chemiluminescence (« Western lightning chemiluminescence reagent plus »; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) avec un anticorps anti-IgG HRP-conjugué (1/1000). Les protéines sont quantifiées par densitométrie avec un numériseur « Molecular Dynamics » (Amersham, Baie d'Urfé, Qc).

### 3.3 DÉTERMINATION DES FONCTIONS HÉPATOSPÉCIFIQUES

#### 3.3.1 SÉCRÉTION D'ALBUMINE

La sécrétion de l'albumine par les hépatocytes est quantifiée à toutes les 24 h, et ce jusqu'à 96 h, dans le milieu de culture à l'aide d'un test ELISA (Uotila *et al.*, 1981), avec quelques modifications mineures (Wan *et al.*, 1993). La concentration d'albumine est déterminée à 550 nm à l'aide d'une courbe standard d'albumine de rat (0–250 ng/dL) sur un lecteur ELISA (SPECTRAFluor Plus, Tecan, CA) et exprimé en microgramme d'albumine/ $10^6$  cellules/24 h.

#### 3.3.2 DÉTERMINATION DU MÉTABOLISME DE L'URÉE

Pour évaluer la biotransformation de l'ammoniaque en urée, les hépatocytes en culture sont exposés à 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans du milieu L-15. Des échantillons de milieu de culture sont récupérés au début et après 24 h d'exposition à l'ammoniaque et ce durant 3 jours. La concentration d'urée est évaluée par un test colorimétrique (« urea nitrogen reagent set » (BioTron Diagnostics, Hemet, CA)). La concentration d'urée est déterminée en utilisant une courbe standard d'urée (0–45 mg/dL) et exprimée en microgramme d'urée/ $10^6$  cellules.

### 3.3.3 ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450

L'activité enzymatique des isoformes CYP1A1 and 2B des hépatocytes en culture est quantifiée après 48 h d'exposition à 10 mM de benzo-a-pyrène dans du milieu L-15. Les cellules ( $2,5 \times 10^5$  cellules/ Pétris) sont lavées 2 fois avec du PBS et incubées durant 1 h avec les substrats éthoxyrésorufin-O-dééthylase (EROD) (8 mM) ou pentoxyrésorufin-O-déalkylase (PROD) (17 mM) (ex: 530 nm; em: 585 nm). L'activité enzymatique est déterminée en utilisant une courbe standard de résorufin (0–200 mM).

L'activité enzymatique basale est mesurée sur une suspension cellulaire pour les isoformes du CYP450 1A1/2 (3-cyano-7-éthoxycoumarin (CEC), ex: 410nm em: 450nm), 2D2 (3-[2-(N,N-diéthyl-N-méthylammonium (3-[2-(N,N-Diethyl-N-méthylammonium)éthyle]-7-méthoxy-4-méthylcoumarin (AMMC), ex: 410nm em: 450nm), 2C6 (7-méthoxy-4-(trifluoro-méthyl)coumarin (MFC), ex: 410nm em: 500nm) and 3A1/2 (3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-diméthyl-4-[4-(méthylsulfonyl)phényl]furan-2(5H)-one (DFB), ex: 340nm em: 450nm). Les cellules sont incubées avec 25µM des différents substrats pour des temps de 0, 5, 10, 15, 20 et 30 min. Après chaque temps d'incubation, à 150µl de suspension est ajouté 150µl d'acétonitrile ou 60% d'acétonitrile avec 40% de Tris base (pH 10, DFB).

Les cultures d'hépatocytes sont induites avec 10 µM benzo-a-pyrène (CYP1A1), 50 µM de dextrométhorphan (CYP 2D2), 50 µM de phénobarbital (CYP 2C6), et 50 µM de dexaméthasone (CYP 3A1/2). Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS puis incubées durant 0, 15 ou 30 min pour les substrats CEC, AMMC et MFC et durant 0, 5, 15, 20 ou 30 min pour le DFB. Pour CEC, AMMC et MFC, 200 µl d'acétonitrile

est ajouté au puits après chaque temps d'incubation. Les cellules sont détachées et 200µl sont transférés dans une plaque de 96-puits pour la lecture. Pour le DBF, après chaque temps d'incubation, 100µl de surnageant est transféré dans une plaque de 96-puits et à chaque puits 100µl de 60% d'acétonitrile-40% de Tris base est ajouté.

### **3.3.4 EXPRESSION DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450**

L'expression protéique de CYP1A1 est déterminée après 24 h d'induction avec benzo-a-pyrène (10 µM). Les cellules ( $2,5 \times 10^5$  cellules/ Pétris) sont lavées avec du PBS, lysées avec 100 µL de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 6 mM β-mercaptoéthanol) et homogénéisées par sonication. Les protéines (30µg) sont séparées par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide 12% (Laemmli, 1970) et ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF). Les membranes sont bloquées dans du TBS-T avec 5% de lait (2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween) et ensuite incubées avec l'anticorps primaire (1/1000). Les bandes de protéines sont détectées par chemiluminescence (western lightning chemiluminescence reagent plus; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) avec un anticorps IgG HRP-conjugué (1/1000). Les protéines sont quantifiées par densitométrie avec le scanner Molecular Dynamics (Amersham, Baie d'Urfé, Qc).

## **CHAPITRE IV**

### **WHEAT EXTRACTS AS AN EFFICIENT CRYOPROTECTIVE AGENT FOR PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES**

Titre: Wheat Extracts as an Efficient Cryoprotective Agent for Primary Cultures of Rat Hepatocytes

Francine Hamel,<sup>1,2,3</sup> Mélanie Grondin,<sup>1,2,3</sup> Francine Denizeau,<sup>2,3†</sup>, Diana A. Averill-Bates,<sup>1,3</sup> Fathey Sarhan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada;  
telephone: (514) 987-3000, ext. 3363; fax: (514) 987-4647;  
e-mail: sarhan.fathey@uqam.ca

<sup>2</sup>Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> Université du Québec à Montréal, Centre TOXEN, Montréal, Québec, Canada

<sup>†</sup>In memory of Professor Francine Denizeau, her endless energy, and her dedication to the pursuit of scientific excellence (March 25, 2004).

Francine Hamel and Mélanie Grondin contributed equally to this work.

Contract grant sponsors: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC); AstraZeneca R&D Montreal

\* par souci pour l'environnement les références ne seront citées qu'à la fin de la thèse



## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse.

Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilités spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Mélanie Grondin : recherche bibliographique, expérimentation, préparation des extraits, mise au point des protocoles, interprétation des données, montage des figures, rédaction.

Francine Hamel : recherche bibliographique, expérimentation, préparation des extraits, mise au point des protocoles, interprétation des données, montage des figures, rédaction.

Diana Averill-Bates : rédaction

Fathey Sarhan : rédaction, encadrement et participation à la planification de l'expérimentation

## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé : Wheat Extracts as an Efficient Cryoprotective Agent for Primary Cultures of Rat Hepatocytes

Soumis pour publication ☐ accepté pour publication ☒ ou publié ☐

dans: Biotechnology and Bioengineering

Auteur principal est:

Mélanie Grondin

Mélanie Grondin 18-7-08  
Signature Date

Directeur de recherche :

Fathey Sarhan

F. Sarhan 18-07-08  
Signature Date

Co-Directeur de recherche :

Diana Averill-Bates

Diana Averill-Bates 18-07-08  
Signature Date

## 4.1 RÉSUMÉ

Les hépatocytes sont un modèle physiologique important pour l'évaluation des effets métaboliques et biologiques des xénobiotiques. Ils ne prolifèrent pas en culture et sont extrêmement sensibles aux dommages induits par la congélation et le dégel, même après l'addition des cryoprotectants classiques. Ainsi, l'amélioration des techniques de cryoconservation est nécessaire pour réduire les dommages cellulaires et fonctionnels. Dans cet article, nous décrivons une nouvelle méthode efficace de cryoconservation, qui permet l'entreposage à long terme et la récupération d'une grande quantité de cellules viables maintenant leurs fonctions hépatospécifiques. En culture, la morphologie des hépatocytes cryoconservés avec les extraits de protéines de blé (WPE) sont semblable à celle des cellules fraîches. En outre, les fonctions hépatospécifiques telles que la sécrétion d'albumine et la biotransformation de l'ammonium en urée sont maintenues durant 4 jours de culture. Les inductions de CYP1A1 et de CYP2B dans les hépatocytes cryoconservés avec les WPEs sont semblables à ceux des hépatocytes frais. Ces résultats démontrent clairement que les WPEs sont d'excellents cryoprotectants pour les hépatocytes primaires. L'extrait permet également de cryoconserver d'autres types cellulaires humains et animaux tels que le carcinome de poumon humain, l'adénocarcinome colorectal humain, le cancer d'ovaire de hamster chinois transfecté avec l'ADN TGF- $\beta$ 1, le cancer du col de l'utérus de **Henrietta Lacks**, les cellules d'épithélium intestinal humain et de la leucémie humaine de cellules T. Les WPEs ont un potentiel d'agent cryoprotecteur universel pour les cellules de mammifères. C'est un agent économique, efficace et non-toxique.

## 4.2 ABSTRACT

Hepatocytes are an important physiological model for evaluation of metabolic and biological effects of xenobiotics. They do not proliferate in culture and are extremely sensitive to damage during freezing and thawing, even after the addition of classical cryoprotectants. Thus improved cryopreservation techniques are needed to reduce cell injury and functional impairment. Here, we describe a new and efficient cryopreservation method, which permits long-term storage and recovery of large quantities of healthy cells that maintain high hepatospecific functions. In culture, the morphology of hepatocytes cryopreserved with wheat protein extracts (WPE) was similar to that of fresh cells. Furthermore, hepatospecific functions such as albumin secretion and biotransformation of ammonium to urea were well maintained during 4 days in culture. Inductions of CYP1A1 and CYP2B in hepatocytes cryopreserved with WPEs were similar to those in fresh hepatocytes. These findings clearly show that WPEs are an excellent cryopreservant for primary hepatocytes. The extract was also found to cryopreserve other human and animal cell types such as lung carcinoma, colorectal adenocarcinoma, Chinese hamster ovary transfected with TGF- $\beta$ 1 cDNA, cervical cancer taken from Henrietta Lacks, intestinal epithelium, and T cell leukemia. WPEs have potential as a universal cryopreservant agent of mammalian cells. It is an economic, efficient and non-toxic agent.

Keywords: liver; cryopreservation; wheat proteins; viability; metabolic activities

### 4.3 INTRODUCTION

Among the different cell types, hepatocytes are the most important for liver function, representing about 70% of the total cellular population and 80% of hepatic tissue volume (Meeks *et al.*, 1991). They are responsible for the majority of hepatospecific functions (Clément et Guillouzo, 1992) such as synthesis and secretion of essential proteins (e.g., ceruloplasmin, clotting factors, albumin). Hepatocytes are also involved in biotransformation of endogenous and exogenous hydrophobic compounds such as xenobiotics (e.g., pharmaceuticals, environmental pollutants) into water soluble products, which are excreted into the extracellular medium (e.g., urine, bile) (Glicklis *et al.*, 2000).

Hepatocytes represent the most physiologically relevant model of the liver, especially as an *in vitro* experimental system for the evaluation of the metabolic fate and biological effects of xenobiotics. The use of other hepatic models such as cell-free microsomes would bias drug biotransformation towards phase I oxidation, whereas liver slices would have a major artefactual problem of limited drug penetration across multiple cell layers. Due to their intact cell properties, hepatocytes represent a self-contained system with complete, undisrupted enzymes and cofactors, which are at physiological levels. For studies of xenobiotic metabolism by the liver, the use of hepatocytes is more likely to yield results which are representative of those obtained *in vivo*, both in terms of metabolic profiles and rates of metabolic clearance (Billings *et al.*, 1977; Houston, 1994; Kedderis, 1997).

Primary cultures of isolated hepatocytes do not replicate without addition of specific growth factors. Furthermore, major xenobiotic-metabolizing enzymes such as inducible isoforms of cytochrome P450 (CYP) decline rapidly in culture. Therefore,

freshly isolated hepatocytes are required for most studies on xenobiotic metabolism and toxicity. The successful cryopreservation of freshly isolated hepatocytes, retaining high viability and adequate liver functions after thawing, would significantly decrease the need for freshly procured livers for the preparation of hepatocytes for experimentation. Cryopreserved hepatocytes of high quality would be of considerable value for investigations in the fields of hepatology, pharmacology, and toxicology (Powis *et al.*, 1987; Santone *et al.*, 1989; Zaleski *et al.*, 1993). The use of cryopreserved hepatocytes from one source would allow investigations on well-defined cell batches. In addition, the same cells could be used in different laboratories, offering the advantage of experimental standardization. Cryopreserved hepatocytes could also be useful for the development of bioartificial liver devices that depend highly on readily available functional units (Gerlach *et al.*, 1989; Gerlach *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1993; Uchino *et al.*, 1991).

Hepatocytes are extremely sensitive to damage during freezing and thawing, even after addition of classical cryoprotectants. Thus improved cryopreservation techniques are needed to reduce cell injury and functional impairment of hepatocytes. Cryoprotective agents such as DMSO are currently used to protect cells and tissues from dehydration caused by the formation of intracellular ice during freezing. However, they are either toxic and need to be eliminated rapidly after freezing (Fahy, 1986) or cause osmotic stress that affects the metabolic competence of cells (Schneider et Mazur, 1987). Consequently, the cryopreserved cells do not represent the native metabolic state of cells or tissues and can lead to erroneous interpretation of results.

To find better alternatives to existing cryoprotectants, scientists have long considered using natural substances made by organisms that survive freezing conditions. To ensure survival, several plants such as winter wheat have evolved efficient strategies that help them to tolerate extreme winter conditions. These mechanisms are

genetically controlled and induced upon exposure to low temperatures (Guy, 1990; Thomashow, 1990). This process, termed cold acclimation (CA), is associated with the development of freezing tolerance (FT). One strategy that hardy plants like wheat use to tolerate subzero temperatures is the accumulation of freezing associated proteins such as antifreeze proteins (AFPs) and dehydrins (Breton *et al.*, 2000). AFPs exhibit two related activities in vitro. The first is the noncolligative depression of the freezing temperature of aqueous solutions relative to their melting temperature, known as thermal hysteresis. The second is inhibition of ice recrystallization (IRI), which is inhibition of the growth of larger ice crystals at the expense of smaller crystals (Knight *et al.*, 1984). Larger ice crystals cause severe dehydration and increase the possibility of physical damage within frozen tissues. IRI occurs at low AFP concentrations (nM) and may represent the physiological function of AFPs in freezing tolerant organisms (Knight et Duman, 1986; Marshall *et al.*, 2004). In addition, AFPs may protect cell membranes from cold-induced damage (Breton *et al.*, 2000). The dehydrins are hydrophilic, resistant to denaturation by boiling and many are composed largely of repeated amino acid sequence motifs. They possess regions capable of forming an amphipathic  $\alpha$ -helix. These properties may enable them to protect cells against freezing damage by stabilizing proteins and membranes during conditions of dehydration (Breton *et al.*, 2000).

This study aims to explore the properties of these wheat proteins to develop an improved method of cryopreservation of isolated hepatocytes and other mammalian cells for long-term storage at liquid nitrogen temperature. Therefore, winter wheat protein extracts (WPE) were investigated as an alternative to the classical cryoprotectant DMSO. This new cryopreservation method permits long-term storage and recovery of large quantities of healthy cells, which maintain the differentiated functions of hepatocytes. This user-friendly technique is inexpensive, does not require extensive manipulation of cells and was successfully used to cryopreserve

other cell types. Wheat extracts have potential as a universal cryopreservant agent of mammalian cells.

#### 4.4 MATERIALS AND METHODS

##### Chemicals

Collagenase, insulin, Williams' medium E (WME), dimethyl sulfoxide (DMSO), resorufin, and other chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Leibovitz medium (L-15), gentamicin, and MEM vitamins were from Gibco/Life Technologies (Burlington, Ont.). Calcein, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and 7-pentoxeresorufin-O-depentyase (PROD) were from Molecular Probes (Eugene, OR). Propidium iodide (PI) was from Calbiochem (San Diego, CA). Antibodies for cytochrome P450 (CYP 1A1 (G-18) goat polyclonal IgG) and anti-goat IgG (horse radish peroxidase (HRP) conjugated mouse anti-goat IgG) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Fetal bovine serum (FBS) was from Medicorp (Montreal, Que).

##### Plant Materials and Growth Conditions

Winter wheat genotype (*Triticum aestivum* L. cv Clair, LT<sub>50</sub> (lethal temperature that kills 50% of seedlings) -19°C) was used in this study. Wheat plants were grown and treated as previously described (Danyluk *et al.*, 1998). Briefly, control plants were grown for 10 days at 20°C and CA was performed at 4°C for a 7-day period.

##### Total Protein Extraction

The aerial parts of seedlings were collected and blended until a homogeneous solution was obtained with cold ultrapure water. The homogenate was filtered



through three layers of miracloth and centrifuged at 30,000g for 45 min at 4°C. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 and sterilized using a 0.22 µm filter. The extract was concentrated by freeze drying and stored at -20°C, or dialyzed against ultrapure water, using 12–14,000 MWCO tubing (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) before concentration. The extract was resuspended in ice-cold WME medium before being added to the hepatocyte suspension.

### **Hepatocyte Isolation and Culture**

Hepatocytes were isolated from male Sprague–Dawley rats (120–180 g) (Charles River Canada, Saint-Constant, Que), in a two-step collagenase digestion technique (Guillemette *et al.*, 1993; Seglen, 1976). Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of experimental animals (Olfert *et al.*, 1993). Cell viability was evaluated by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON) with 2 mM PI (Reader *et al.*, 1993). Isolated cells were diluted to  $3.5 \times 10^5$ /mL and cultured in tissue culture plates (Corning, Acton, MA) in WME medium supplemented with 10% FBS, insulin (0.2 mg/mL), and gentamicin (50 mg/mL) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. After 3 h, medium was changed and cells were incubated overnight in L-15 medium (Reader *et al.*, 1993) supplemented with insulin and gentamicin.

### **Cryopreservation of Hepatocytes and Cell Lines**

Immediately after isolation, the hepatocyte suspension was added to ice-cold WME medium supplemented with 10% FBS and non-acclimated (NA) or CA WPEs in cold cryovials. The following cell lines were cryopreserved in their respective growth media supplemented with NA WPE: A549 (human lung carcinoma), Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma), CHO-B1 (Chinese hamster ovary transfected with TGF-

b1 cDNA), HeLa (cervical cancer taken from Henrietta Lacks), HIEC (human intestinal epithelium cells), and Jurkat (human T cell leukemia). Positive (15% DMSO+50% FBS) and negative (WME) controls were also prepared. Tubes containing cells were frozen at a cooling rate of 1°C/min in a controlled freezing container (Nalgene, Rochester, NY) to -80°C for 1 day, and then transferred to liquid nitrogen.

### **Thawing of Cryopreserved Hepatocytes and Cell Lines**

Frozen cells were thawed quickly by gentle agitation in a 37°C water bath and viability was determined. For adherence and metabolic assays, the hepatocyte suspension was diluted 10-fold with cold WME medium, immediately after thawing. When viability was lower than 80%, dead cells were removed by a 30% isotonic Percoll centrifugation step. After centrifugation (4°C, 50g, 2 min), hepatocytes were suspended in 10 mL of WME medium and washed twice. Hepatocytes ( $3.5 \times 10^5$ /mL) were cultured in tissue culture plates in WME medium supplemented with insulin and gentamicin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. After 3 h, medium was changed and cells were incubated overnight in L-15 medium supplemented with insulin and gentamicin.

### **Viability Assays**

#### **Live-Dead Assay**

After freeze/thaw cycles, cell suspensions were stained immediately with the fluorescent probes 4 µM calcein and 2 µM PI in WME medium for 5 min and analyzed by flow cytometry (excitation at 488 nm) using a Becton Dickinson FACScan. The numbers of live cells expressing green fluorescence of calcein and

dead cells expressing red fluorescence of PI were determined with Cell Quest software (Becton Dickinson).

### **Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay**

LDH activity was determined in the medium of seeded, adherent hepatocytes as a measure of hepatocyte deterioration (Moldeus *et al.*, 1978). The hepatocyte culture medium was removed daily and activity of LDH released into the medium from adherent cells was quantified. The live cells were then lysed with 10% Triton X-100 at the end of the experiment and activity of LDH was quantified to give the total cell number (Moffatt *et al.*, 1996).

### **Plating Efficiency**

Plating efficiency was determined by measuring LDH activity in cells prior to seeding and in 3 and 24 h-old cultures. Plating efficiency was defined as LDH activity in 24 h-old cultures divided by LDH activity in pre-culture cells.

### **Adherence and Cellular Morphology**

Adherence and morphology of hepatocytes in tissue culture plates coated with collagen were evaluated by confocal microscopy. The confocal microscope MRC1024 (BioRad, Microscience, Cambridge, MA) was equipped with an argon laser (excitation at 488 nm) combined with an inverted microscope Eclipse Model TE 3000 (Nikon, Montreal, Que) with objectives of 40X Hoffman.

### **Albumin Secretion**

Albumin secretion from hepatocytes was quantified every 24 h, until 96 h, in culture media by a ELISA assay (Uotila *et al.*, 1981), with minor modifications (Wan *et al.*, 1993). Albumin concentrations were determined at 550 nm using a standard curve of rat albumin (0–250 ng/dL) using an ELISA reader (SPECTRAFluor Plus, Tecan, CA) and the LDH viability test, then expressed as microgram albumin/ $10^6$  cells/24 h.

### **Urea Determination**

To evaluate hepatocyte-mediated biotransformation of ammonia to urea, seeded hepatocytes were exposed to 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in L-15 culture medium. Samples of media were collected at the beginning and after 24 h intervals of exposure to ammonia, during 3 days. Urea concentration was measured colorimetrically using the urea nitrogen reagent set (BioTron Diagnostics, Hemet, CA) and an ELISA reader at 540 nm. Concentrations of urea were determined using a standard curve of urea (0–45 mg/dL) and the LDH viability test, then expressed as micrograms urea/ $10^6$  cells.

### **Enzymatic Activity and Protein Expression of Cytochrome P450 Isoforms**

CYP1A1 and 2B enzymatic activities were measured in hepatocyte cultures induced with benzo-a-pyrene (10  $\mu\text{M}$ ). Cells were washed twice with PBS and incubated for 1 h with the substrates EROD (8  $\mu\text{M}$ ) or PROD (17  $\mu\text{M}$ ) (lexc: 530 nm; lem: 585 nm). Enzymatic activity was determined using a standard curve of resorufin (0–200 mM). CYP1A1 protein expression was determined after 24 h induction with benzo-a-pyrene (10  $\mu\text{M}$ ). Cells were washed with PBS, scraped off plates and suspended in 100 mL of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 6 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and homogenized by sonication. Proteins were separated by SDS-PAGE with 30  $\mu\text{g}$  protein on 12% polyacrylamide gels (Laemmli, 1970) and then

blotted onto polyvinylidene fluoride membrane. Membranes were blocked with 5% dry milk in TBS (2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl) supplemented with 0.1% Tween-20 and incubated with CYP1A1 antibody (1/1,000). Protein bands were detected by chemiluminescence (Western lightning chemiluminescence reagent plus; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) using a HRP-conjugated anti-goat IgG (1/1,000). Proteins were quantified by densitometry using a Molecular Dynamics scanner (Amersham, Baie d'Urfé, Que) and IP Lab gel software (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA).

### **Statistical Analysis**

Quantitative results were expressed as mean  $\pm$  SD of at least three replicate dishes for each condition with a minimum of three experimental repeats using different cell preparations. Data were normalized to non-cryopreserved experimental controls at each time interval in the same experiment. Comparison between groups and analysis for differences between means of control and treated groups were performed using ANOVA followed by the post hoc test Newman-Keuls ( $P < 0.05$ ). The threshold for statistical significance was:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), and  $P < 0.001$  (\*\*\*).

## 4.5 RESULTS

### Cryopreservation of Rat Hepatocytes Using Classical Techniques

The optimal protocol for cryopreservation of freshly isolated hepatocytes was determined using DMSO. Hepatocyte concentrations ranging from  $1.5$  to  $5 \times 10^6$  cells/mL were frozen to  $-80^{\circ}\text{C}$  in Williams' medium supplemented with 10% FBS and 5–25% DMSO (data not shown). The rate of freezing was assessed using three different freezing methods: Styrofoam (4 h at  $-20^{\circ}\text{C}$ , 18 h at  $-80^{\circ}\text{C}$ ), a programmable freezer ( $-6^{\circ}\text{C}/\text{h}$  until  $-20^{\circ}\text{C}$ , then 18 h at  $-80^{\circ}\text{C}$ ) or a Nalgene apparatus ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until  $-80^{\circ}\text{C}$  for 18 h). Optimal conditions for cryopreservation of hepatocytes were a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL and freezing in the Nalgene apparatus using 15% DMSO. These conditions served as a reference for classical cryopreservation in subsequent experiments.

### Cryopreservation Potential of WPEs on Rat Hepatocytes and Cell Lines

The ability of WPEs to improve the viability of cryopreserved rat hepatocytes and other cell types, was compared to the classical standard, DMSO. Figure 1A presents the viability of suspensions of hepatocytes after 7 days of freezing in the presence of WPEs, proteins and DMSO, compared to fresh hepatocytes. The viability of hepatocytes that were cryopreserved with 15% DMSO+50% FBS (positive control) was 62.5%, compared to 86.3% for freshly isolated hepatocytes. When 15% DMSO+20 mg of BSA were used, the viability of cryopreserved hepatocytes was only 38.7%. On the other hand, very low viability was obtained with 20 mg of BSA, WME medium, 20 mg of FBS, or E. coli proteins (3.9, 1.6, 6.5, and 3.3%, respectively). However, significant results were obtained with 20 mg of NA WPE, giving viability of 68.4%, which was comparable to that obtained with the classical

cryoprotectant, DMSO. In comparison, 20 mg of CA WPE gave a viability of 35.8% (Fig. 1A). Certain phenolic compounds accumulate during CA of wheat and may contribute to this decrease in the viability of hepatocytes. Furthermore, increases in the solute concentration of the CA WPE (927 mOsm) compared to the NA WPE (602 mOsm) could further dehydrate the hepatocyte cells and increase damage due to dehydration. This could also contribute to the reduction in the post-thaw viability of hepatocytes that were cryopreserved with CA WPE (35.8%, Fig. 1A) compared to the NA WPE (68.4%, Fig. 1A). Furthermore, dialysis of the CA and NA WPEs to remove contaminants such as phenolic compounds increased the post-thaw viability of hepatocytes to  $66.1 \pm 2.4$  and  $78.6 \pm 1.7\%$ , respectively. This was accompanied by a reduction in their respective solute concentrations to 411 and 330 mOsm, which is 66% and 45% less than their initial osmolarity.

Cryoprotective activity of WPEs was also evaluated for the cryopreservation of several cell lines. Figure 1B presents viability of the different cell lines after 7 days of freezing in the presence of WPEs and DMSO, compared to fresh hepatocytes. Viability of A549, Caco-2, CHO-B1, HeLa, HIEC, and Jurkat cells cryopreserved with DMSO was 45.6%, 33%, 72.1%, 65.4%, 45.8%, and 53.8%, respectively, compared to 60.4%, 77.3%, 81.4%, 65.4%, 80.3%, and 87.7%, respectively, for cryopreservation with WPEs (Fig. 1B). These findings demonstrate that WPEs contain specific compounds with cryoprotective activity at least equivalent to the commonly used cryoprotectant, DMSO.

Hepatocyte viability was also assessed by the release of LDH, which measures loss of viability in culture by providing indirect measurement of cellular membrane integrity. Viability for adherent hepatocytes cryopreserved with WPEs was better than that obtained with DMSO (Fig. 2). After 24 h in culture, high viabilities of 76.4% and 89.3% were obtained for hepatocytes cryopreserved with NA and CA WPEs, respectively, compared to 60.2% for DMSO. WPEs improved viability, compared to

DMSO, throughout the 96 h culture period. WPEs improved viability to similar levels as in fresh hepatocytes during 96 h.

#### Plating Efficiency, Adherence, and Morphology of Cryopreserved Rat Hepatocytes

The ability of thawed cells to survive in culture is one of the most important criteria for successful cryopreservation of hepatocytes. Plating efficiency of cells was assessed 3 and 24 h after seeding and culture. After 3 h in culture, plating efficiencies of thawed hepatocytes cryopreserved with NA and CA WPEs were very similar to the optimized DMSO standard (63.7 and 62.5%, respectively, compared to 64.9% for DMSO, Table I). After 24 h, plating efficiency was about 50% for thawed hepatocytes cryopreserved with DMSO, NA, and CA WPEs, relative to non-cryopreserved hepatocytes (100%) (Table I). These findings demonstrate that hepatocyte plating efficiency was comparable in the presence of WPEs and the optimized DMSO standard, after 3 h and 24 h in culture.

Morphological analysis by confocal microscopy is shown 24 h after seeding for thawed hepatocytes that were cryopreserved with WPEs (Fig. 3C and D) or DMSO (Fig. 3B), compared to freshly isolated hepatocytes (Fig. 3A). At the same cell concentration, fresh and WPE-cryopreserved hepatocytes showed similar rounded cellular morphology (Fig. 3A, C, and D), whereas those cryopreserved with DMSO had shrunk (Fig. 3B). Moreover, cell to cell contacts were observed for the fresh, NA and CAWPE-cryopreserved hepatocytes, but not for DMSO-cryopreserved hepatocytes in which we can observe aggregates of dead cells (uptake of PI) appearing as cells adhering to one another. Cells cryopreserved with WPEs appear to be slightly larger than the fresh cells, however, their measured size under the microscope was not significantly different. They appear larger because of their apparent opacity under confocal microscopy with the Hoffman objective. In fact, the NA and CA protein extracts were added to the hepatocyte cells at relatively high



protein concentration. After cryopreservation, it is plausible that the WPE proteins have aggregated at the cell membrane of the hepatocytes, giving rise to their apparent microscopic opacity. Indeed, it is possible to see these protein aggregates attached to the Petri dishes between the cells.

#### Albumin Secretion by Cryopreserved Rat Hepatocytes

Albumin secretion is a specific marker for protein synthesis in hepatocytes because it requires liver-specific gene expression and intact translational and secretory pathways. The effects of WPEs on albumin production by cryopreserved hepatocytes were monitored during 4 days after seeding in culture (Fig. 4A). Albumin secretion by freshly isolated hepatocytes, supplemented or not with WPEs, decreased progressively with time from day 1 to 4, although the decrease was much more rapid in cells that had been cryopreserved with DMSO. In fresh hepatocytes, 85% of albumin secretory activity was maintained after 4 days in culture, compared to 48% in DMSO-cryopreserved cells. However, 83% of activity was maintained in hepatocytes that were cryopreserved with CA WPEs after 4 days, which is comparable to that of fresh hepatocytes. When hepatocytes were cryopreserved with NA WPEs, levels of albumin secretion were approximately 30% less than those cryopreserved with CA WPEs. These results demonstrate that the hepatospecific function of albumin secretion was well maintained throughout the 4-day culture period in WPE cryopreserved hepatocytes and was considerably improved with CA WPEs, compared to DMSO (Fig.4A).

#### Ammonium Detoxification by Cryopreserved Rat Hepatocytes

The effects of WPEs on ammonium detoxification by cryopreserved hepatocytes were measured at day 2, 3, and 4 after seeding in culture, compared to fresh cells (Fig. 4B). Urea production by freshly isolated cells decreased progressively with time and

was much lower in DMSO-cryopreserved hepatocytes. Fresh hepatocytes, supplemented or not with WPEs, maintained 55% of initial detoxification activity, compared to 16% for DMSO-treated cells after 4 days in culture. However, after subtraction of plant arginase activity, ammonium detoxification in hepatocytes cryopreserved with CA and NAWPEs was similar to fresh cells from 48 to 96 h. These findings indicate that the hepatospecific function of ammonium detoxification was well maintained throughout the 4-day culture period with WPEs, relative to DMSO (Fig. 4B).

#### Cytochrome P450 Enzyme Activities of Cryopreserved Rat Hepatocytes

The activity of xenobiotic-metabolizing CYP enzymes was evaluated as a third marker of hepatospecific functions. Metabolic activity of isoforms CYP1A1 and CYP2B was measured by the EROD (CYP1A1) and PROD (CYP2B) assays after a 24 h induction with benzo-a-pyrene (Fig.5A). Compared to fresh hepatocytes, supplemented or not with WPEs, the relative activity of CYP1A1 and CYP2B enzymes decreased slightly in DMSO-cryopreserved hepatocytes, while it was maintained in hepatocytes cryopreserved with NA and CA WPEs. Western blot analysis of the CYP1A1 isoform demonstrated that increased benzo-a-pyrene inducible activity was associated with increased protein expression (Fig. 5B). This indicates that metabolic activity of the CYP1A1 and CYP2B isoforms was also improved in WPE-cryopreserved hepatocytes, compared to DMSO (Fig. 5A and B).

## 4.6 DISCUSSION

The major problems with classical methods of hepatocyte cryopreservation are low survival rate in culture and poor metabolic activities and functional integrity. Unlike cell lines, hepatocytes do not replicate in culture. Thus an efficient method of cryopreservation is necessary to reduce cellular and functional damage incurred in hepatocytes during freezing.

To find an alternative to currently available cryoprotectants, we explored the use of substances made by organisms that survive freezing conditions. Over wintering plants such as winter wheat accumulate compounds that ensure survival of the plant during freezing. These compounds include sugars, amino acids, and proteins such as AFPs and dehydrins. These proteins have the potential to protect cells against dehydration caused by freezing. These properties could be advantageous for cryopreservation of hepatocytes. We therefore investigated whether protein extracts from cold tolerant wheat could act as cryopreservation agents of rat hepatocytes. Our results clearly demonstrated that 20 mg of NA WPE (68.4% viability) was as efficient as 15% DMSO supplemented with 50% FBS (62.5% viability) for the cryopreservation of hepatocytes. However, 20 mg of CA WPE gave a lower viability of 35.8%, which could be due to certain phenolic compounds that are known to accumulate during CA of wheat, as well as the increase in osmolarity of the CA WPE. Other cold tolerant plants such as barley, rye, alfalfa, and spinach also possessed cryoprotective activity for hepatocytes (data not shown). Cryoprotective activity is specific to plant extracts, since BSA and *E. coli* proteins did not show any activity.

Eukaryotic cell models are essential in most laboratories that study or utilize proteomics, genomics, microarray-, and RNA-based technologies, and consequently

the long-term cryostorage of these cell cultures is required. The relevance of the cryopreservation technology with WPEs to other eukaryotic cell types was also investigated. There was a 2.3, 1.7, 1.6, and 1.3-fold increase in the viability of the Caco-2, HIEC, Jurkat, and A549 cell lines cryopreserved with NA WPE compared to that with DMSO. The viability of the CHO-B1 and HeLa cell lines cryopreserved with NA WPE was similar to that of DMSO. This suggests that WPE is a better cryoprotective agent than DMSO for cryopreservation of eukaryotic cells and thus could be used as a universal cryoprotectant.

The LDH test further demonstrated that hepatocytes cryopreserved with NA and CA WPEs maintained better viability in culture than those that were cryopreserved with DMSO. Furthermore, the viability of WPE-cryopreserved hepatocytes was similar to that of fresh hepatocytes, suggesting that WPEs are less toxic and more efficient as cryopreservation agents than DMSO.

To further determine the capacity of hepatocytes to survive in culture after cryopreservation, the plating efficiency of cells was compared after 24 h in culture. Both the WPE cryopreserved hepatocytes and the optimized DMSO standard performed well with similar attachment efficiencies in the range of 50%, relative to fresh cells. These results for optimized DMSO-cryopreserved hepatocytes were similar to those obtained in other studies (Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005). Microscopic analysis of post-thaw hepatocytes demonstrated their ability to attach to collagen-coated dishes and to restore near-normal morphology with cell to cell contacts, following cryopreservation with WPEs. The attachment properties and cellular morphology were better conserved in hepatocytes that had been cryopreserved with WPEs, rather than with DMSO, demonstrating again the higher efficiency of WPEs to cryopreserve hepatocytes. Cell to cell contacts were present in WPE-cryopreserved hepatocytes, suggesting better conservation of membrane integrity.

A major interest of the pharmaceutical industry during the development of new drugs for clinical use relies on short term assays for determining metabolic profiles and rates of metabolic clearance, in either freshly isolated or cryopreserved hepatocytes. In our study, the rate of albumin secretion by fresh and DMSO-cryopreserved hepatocytes shows the typical pattern of albumin synthesis in primary hepatocytes in vitro (Guillouzo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001b; Son *et al.*, 2004). Rates of albumin secretion by DMSO-cryopreserved hepatocytes during 4 days were lower than those of fresh hepatocytes and this is likely attributed to damage caused by freezing. The albumin secretion rates of NA and CA WPE cryopreserved hepatocytes also showed a similar pattern of albumin synthesis to that of fresh hepatocytes in vitro (Guillouzo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001b; Son *et al.*, 2004; Sosef *et al.*, 2005), again demonstrating the advantage of WPEs as cryoprotective agents.

Urea synthesis requires a high energy demand from the cell and is a sensitive index of energy metabolism in hepatocytes (Zaleski et Bryla, 1978). DMSO-cryopreserved hepatocytes synthesized urea at lower rates compared to fresh cells, in agreement with Silva et coll. (1999) and Sosef et coll. (2005). In contrast, after 3 and 4 days post-seeding, WPE-cryopreserved hepatocytes maintained their ammonium detoxification function at a similar level to that of fresh hepatocytes. These results show the potential of WPEs to maintain intact the primary metabolic activities of protein synthesis, liver-specific gene expression, translational, and secretory pathways.

Finally, cryopreserved hepatocytes were challenged to determine if they could retain their capacity to respond to CYP inducers. DMSO-cryopreserved hepatocytes retain most of the drug-metabolizing activities (Li *et al.*, 1999), as well as their ability to induce the drug-metabolizing enzymes (Hengstler *et al.*, 2000a; Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005). We demonstrated that DMSO-cryopreserved cells responded to

CYP1A1 and CYP2B inducers in a similar manner to fresh cells, although with a slightly lower induction rate. Benzo-a-pyrene induction of CYP1A1 activity correlated with an increase in the rate of CYP1A1 protein synthesis, in agreement with other studies (Madan *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999). For NA and CA WPE-cryopreserved hepatocytes, we observed the same induction in rate of activity as fresh cells, and a lower protein synthesis induction rate only in CA WPE-cryopreserved hepatocytes. These results suggest that WPE-cryopreserved hepatocytes retained their metabolic activity and their capacity to respond to CYP inducers more efficiently than DMSO-cryopreserved cells. This confirms that WPEs are better cryopreservative agents than DMSO for primary rat hepatocytes. Moreover, we demonstrated that the metabolic activities of the cryopreserved hepatocytes are maintained for at least 4 days, which fulfills the requirements of the pharmaceutical industry for short-term assays to determine the metabolic profile and rates of metabolic clearance.

The NA and CA WPEs are composed mostly of proteins and traces of other compounds such as sugars (glucose, fructose, sucrose, and trehalose), glycine betaine (an organic osmolyte), antioxidants, and phenolic compounds. When the extract was boiled, there was a significant loss of cryoprotective activity suggesting that the active cryoprotective substances are of a protein nature. In addition, supplementation of the media with different sugars, glycine betaine, and trehalose, did not significantly improve the cryopreservation of hepatocytes, confirming that the active compounds are indeed the wheat proteins. These active proteins are likely to be a mixture of the freezing associated proteins present in winter wheat extract. The freezing associated proteins have the properties of protecting cell membranes against dehydration caused by extracellular ice formation. It is also possible that the wheat proteins interact with the membrane bilayers and reduce the elevation of membrane transition temperature and thus reduce the occurrence of non-lamellar phases (Breton *et al.*, 2000). However, the exact function of the winter WPE remains unknown.

In conclusion, this study clearly demonstrates that the WPE is an efficient cryopreservation agent of hepatocytes and other cell types. There was a minimal loss of cells and hepatocytes retained their metabolic activities in a similar manner to fresh cells. The WPE is a non-toxic natural product, which is economic and easy to prepare. It is an efficient universal cryoprotectant that could replace DMSO, which has severe limitations due to cellular toxicity. However, it will be of interest to identify specific protein(s) that confer these beneficial cryoprotective properties and to elucidate their functions.

The authors thank Michel Marion and Denis Flipo for technical assistance. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; F.D., F.S.) and by AstraZeneca R&D Montreal. In memory of Moustafa Shereen and Madeleine Gobeille-Labrie, great friends, whose courage in fighting liver disease inspired us to work in this area of research.

Table I. Plating efficiency of thawed rat hepatocytes following cryopreservation with WPEs compared to an optimized DMSO standard\*.

Culture period (hours)	Fresh	Cryopreserved		
		DMSO <sup>a</sup>	NA	CA
3	77.3 ± 0.5	64.9 ± 1.7	63.7 ± 1.5	62.5 ± 0.4
24	100.0 ± 2.4	50.3 ± 4.1	50.9 ± 2.9	52.5 ± 3.4

Data are expressed as mean ± SEM from three different experiments.

\*Plating efficiency was evaluated by LDH activity in freshly isolated and cryopreserved hepatocytes, as described in the Materials and Methods.

<sup>a</sup> Optimized DMSO concentration of 15% for cryopreservation of rat hepatocytes.



#### 4.7 LEGENDS

Figure 1. Cryopreservation potential of WPEs on isolated rat hepatocytes and other cell types.

A: Viability of suspensions of hepatocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) after 7 days of freezing was evaluated with calcein/PI by flowcytometry. Hepatocytes were frozen in WME 10% FBS supplemented with 50% FBS (FBS), 20mg of BSA (BSA), or 20 mg of E. coli proteins (E. coli) or 15% DMSO, and 20 mg of BSA (DMSO+BSA) or 15% DMSO, and 50% FBS (DMSO) or 20mg of NA or CA WPEs. B: Viability of several eukaryotic cell types after 7 days of freezing was evaluated by flow cytometry using calcein/PI. Viability of A549 (human lung carcinoma), Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma), CHO-B1 (Chinese hamster ovary transfected with TGF- $\beta$ 1 cDNA), HeLa (cervical cancer cells taken from Henrietta Lacks), HIEC (human intestinal epithelium cells), and Jurkat (human T cell leukemia) cell lines ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was evaluated in their respective growth media supplemented with DMSO or WPEs NA Clair (NA). Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of WPEs in at least six independent experiments with different cell preparations (n = 54).

Figure 2. Viability of cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.

Viability was determined over a 4-day period after seeding thawed rat hepatocytes that had been cryopreserved for 7 days in WME supplemented with 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), NA and CA WPEs. Viability (%) was obtained by subtracting LDH released by damaged hepatocytes from total cellular LDH. Total LDH was evaluated by lysing cells with 10% Triton X-100. Freshly isolated hepatocytes served as reference. Controls were used to subtract intrinsic plant activity. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of WPEs from

four independent experiments with different cell preparations (n=36). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Figure 3. Analysis of adherence and cellular morphology of cryopreserved hepatocytes.

Adherence was visualized 24 h after seeding thawed rat hepatocytes, following cryopreservation for 7 days in WME 10% FBS supplemented with 15% DMSO and 50% FBS (B), WPEs NA (C), or CA (D). Freshly isolated hepatocytes (A) served as reference. Solid arrows indicate cell to cell contacts; empty arrows indicate aggregates of dead cells. Hepatocytes ( $175 \times 10^3$ ) were visualized by confocal microscopy under 40X Hoffman (A–D). Photographs are from one representative experiment, which was repeated at least in triplicate.

Figure 4. Albumin secretion and detoxification of ammonium to urea by cryopreserved hepatocytes: beneficial effect of WPEs.

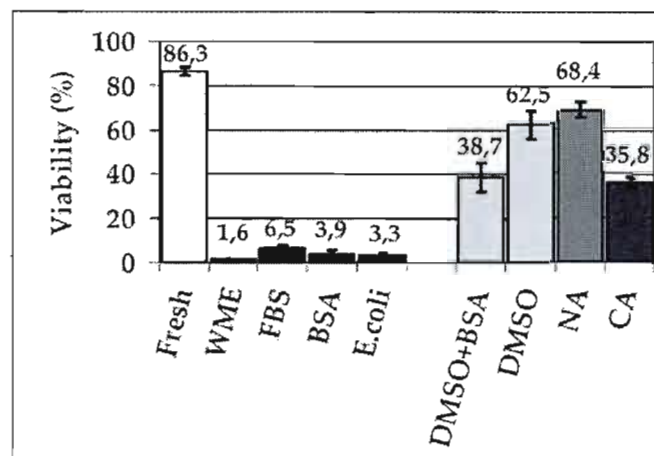
A: Albumin secretion ( $\text{mg}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ h}$ ) in culture medium over a 4-day period after seeding thawed rat hepatocytes and (B) production of urea ( $\text{mg}/10^6 \text{ cells}$ ) during 24 h intervals after 1, 2, and 3 days in culture, for thawed rat hepatocytes following cryopreservation for 7 days in WME supplemented with 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), WPEs NA, and CA. Total cell number was evaluated by the LDH activity assay. Freshly isolated hepatocytes supplemented with WPEs served as reference. Controls were used to subtract intrinsic plant activity. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of WPEs from four experiments with different cell preparations (n=36). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Figure 5. Activity and expression of cytochrome P450 isoenzymes in cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.

A: Activity of cytochrome P450 isoforms CYP1A1 and CYP2B and (B) expression of CYP1A1, 48 h after seeding thawed rat hepatocytes following cryopreservation for 7 days in WME supplemented with 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), WPEs NA and CA. Freshly isolated hepatocytes supplemented with WPEs (Fresh) served as reference. A: The induction rate of cytochrome P450 isoforms was measured by EROD (CYP1A1) and PROD (CYP2B) assays after 24 h induction with benzo-a-pyrene. B: Immunodetection of CYP1A1 after 24 h induction with benzo-a-pyrene (+) and quantification by densitometry. Rate of induction is the ratio between the density of the non-induced (-) versus induced (+) lane. Membrane staining (Coomassie blue) was used to confirm protein loading (data not shown). Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements from four independent experiments (n=12). Immunodetection (B) of proteins is shown from one representative experiment, which was repeated at least in triplicate. \*P<0.05.

## 4.8 FIGURES

A



B

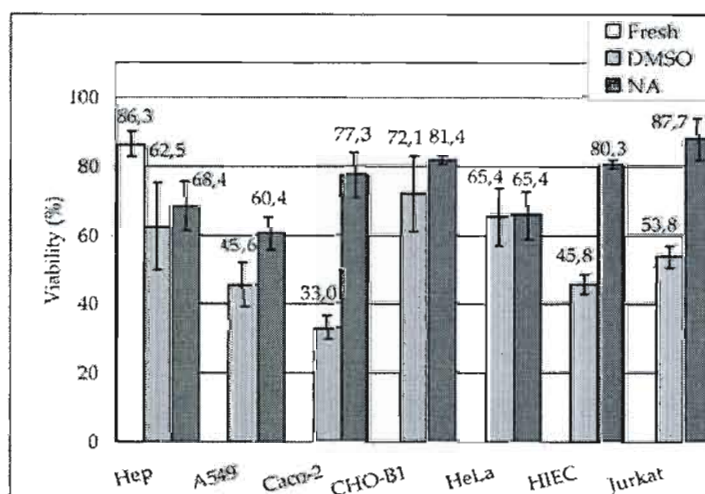


Figure 1 Cryopreservation potential of WPEs on isolated rat hepatocytes and other cell types.

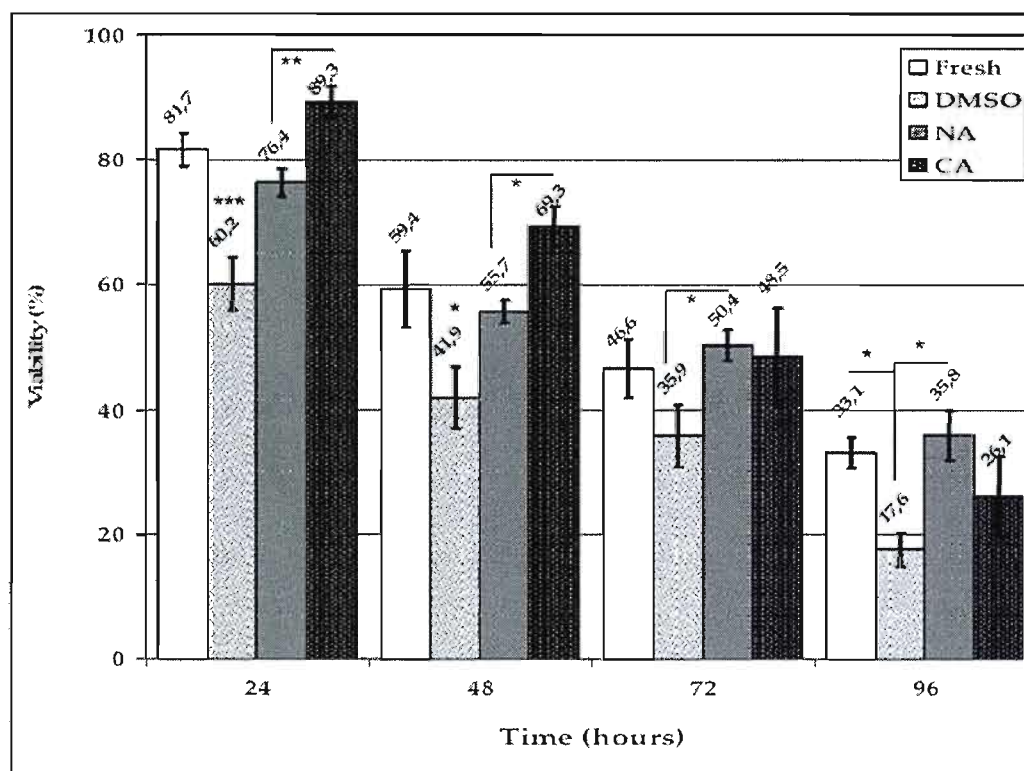


Figure 2 Viability of cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.

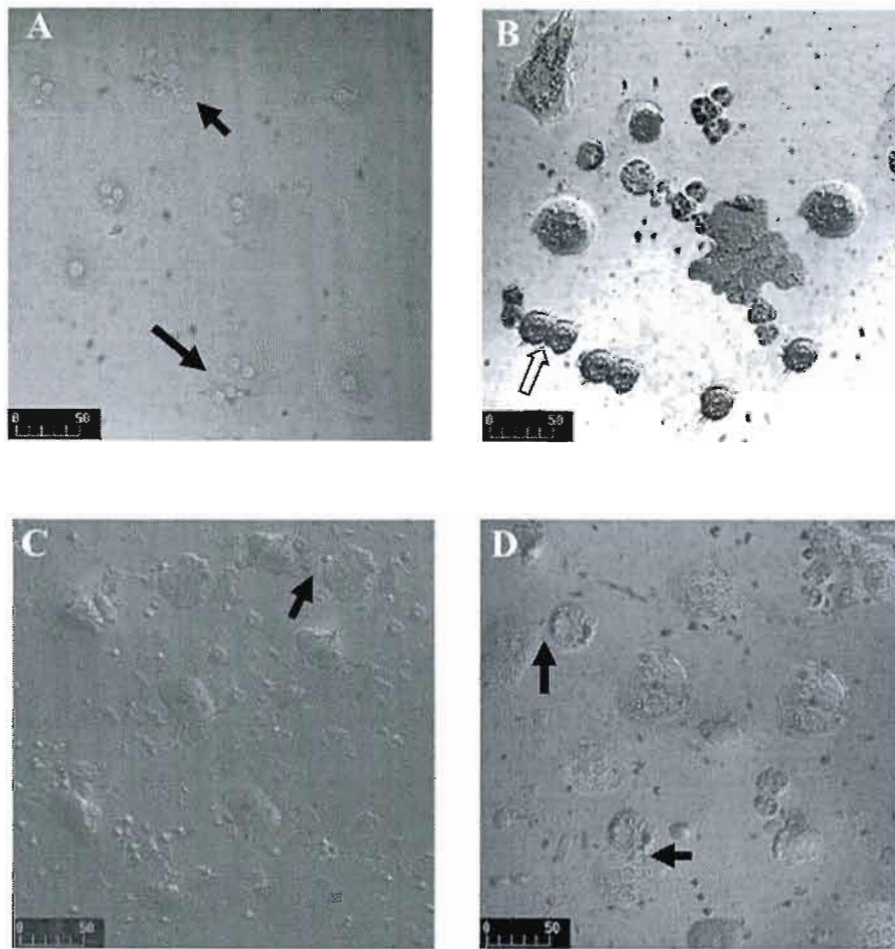
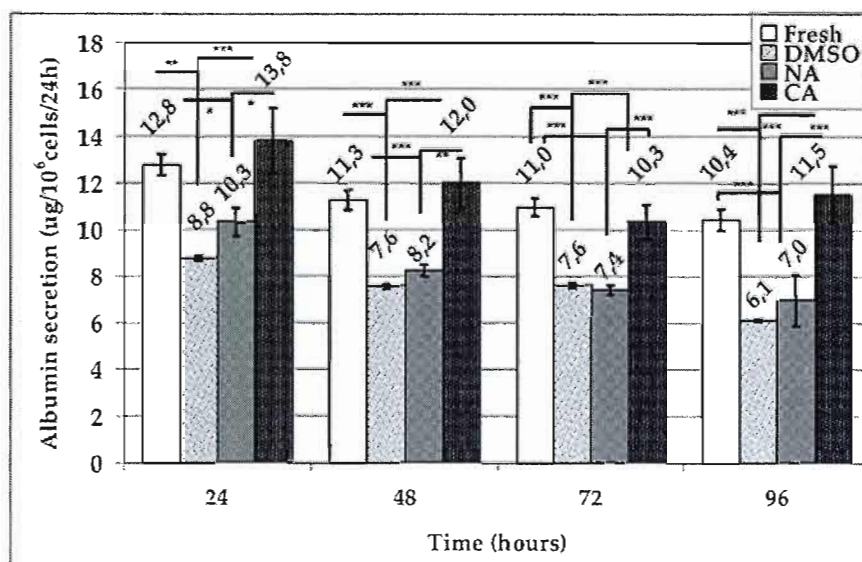


Figure 3 Analysis of adherence and cellular morphology of cryopreserved hepatocytes.

A)



B)

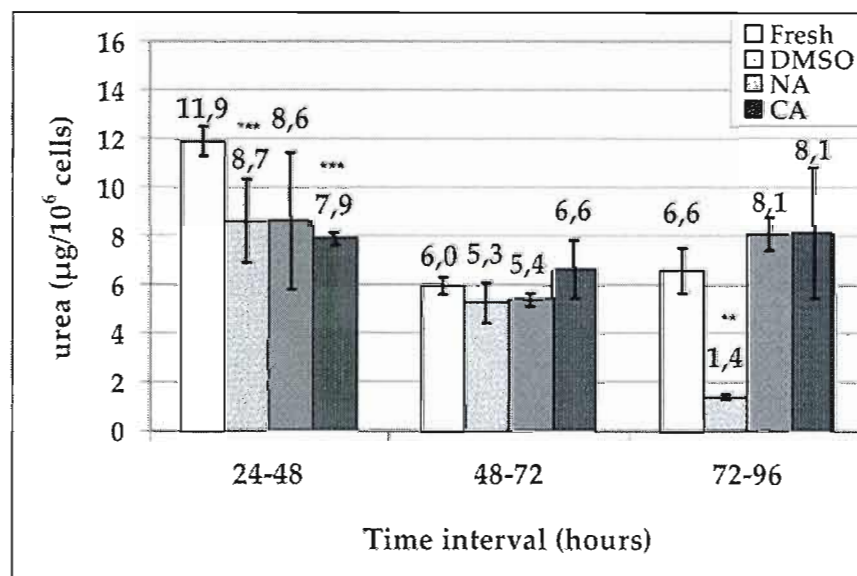
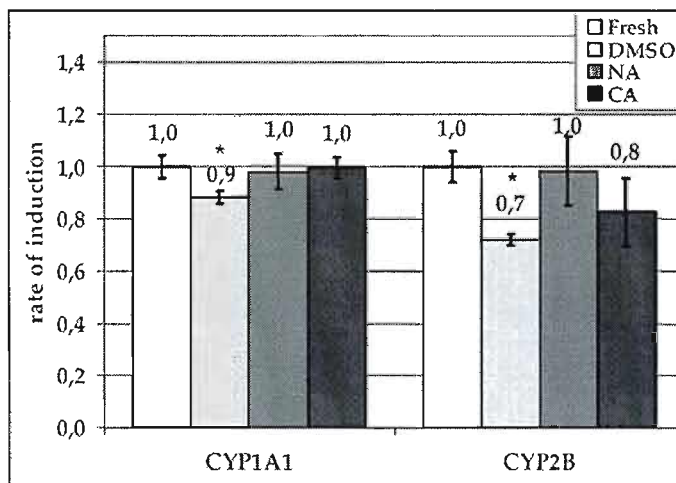


Figure 4 Albumin secretion and detoxification of ammonium to urea by cryopreserved hepatocytes: beneficial effect of WPEs.

A)



B)

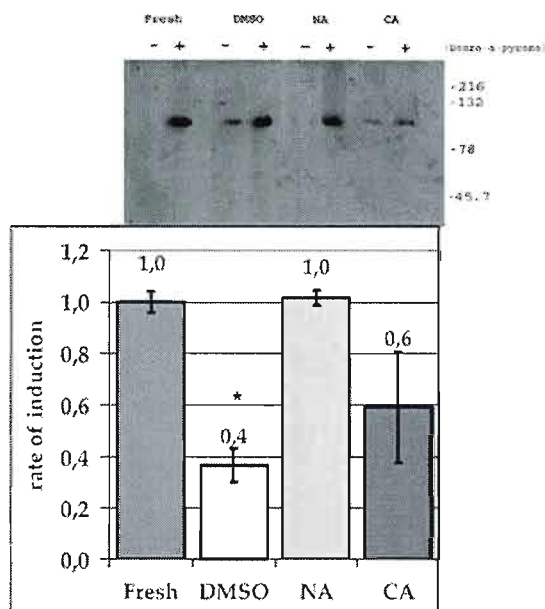


Figure 5 Activity and expression of cytochrome P450 isoenzymes in cryopreserved hepatocytes: effect of WPEs.



## **CHAPITRE V**

### **METABOLIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P450 ISOFORMS IN HEPATOCYTES CRYOPRESERVED WITH WHEAT PROTEIN EXTRACT.**

**Title:** Metabolic activity of cytochrome P450 isoforms in hepatocytes cryopreserved with wheat protein extract.

**Authors:** Mélanie Grondin, Francine Hamel, Fathey Sarhan and Diana A. Averill-Bates

Corresponding author: Dr Diana A. Averill-Bates  
 Université du Québec à Montréal  
 Département des Sciences biologiques  
 C.P. 8888, Succursale Centre-ville  
 Montréal, Québec H3C 3P8  
 Canada  
 Telephone : (514) 987-3000, ext. 4811  
 Fax : (514) 987-4647  
 E-mail : averill.diana@uqam.ca

List of Abbreviations: AMMC: 3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium) ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin, CEC: 3-Cyano-7-ethoxycoumarin, CYP: cytochrome p450, DFB: [3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]furan-2(5H)-one], DMSO: dimethyl sulfoxide, FBS: Fetal bovine serum, I: induced, Leibovitz medium, MFC: 7-methoxy-4-(trifluoro-methyl)coumarin, NI, non-induced, PI: propidium, L-15:, .WME: William's Media, WPE: Wheat protein extract.

\* par souci pour l'environnement les références ne seront citées qu'à la fin de la thèse

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilités spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Mélanie Grondin : rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, mise au point des protocoles, conceptualisation des manipulations en regard de notre problématique, préparation des extraits.

Francine Hamel : participation à la mise au point des protocoles et conceptualisation des manipulations.

Diana Averill-Bates : rédaction

Fathey Sarhan : rédaction, encadrement et participation à la planification de l'expérimentation

## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé: Metabolic activity of cytochrome P450 isoforms in hepatocytes cryopreserved with wheat protein extract

Soumis pour publication ☐ , accepté pour publication ☐ , ou publié ☒  
dans : Drug metabolism and disposition (MS ID#: DMD/2008/021162)

Auteur principal est:

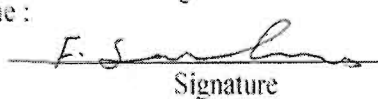
Mélanie Grondin

  
Signature

18-7-08  
Date

Directeur de recherche :


Fathey Sarhan

  
Signature

18-07-08  
Date

Co-Directeur de recherche :

Diana Averill-Bates

  
Signature

18-07-08  
Date

## 5.1 RÉSUMÉ

La recherche et développement de médicaments exigent que la toxicité des nouveaux médicaments soit déterminée avant qu'ils ne puissent être administrés aux patients. Les hépatocytes de rats sont utilisés *in vitro* pour étudier des composés au niveau de leur hépatotoxicité, leur induction des enzymes du métabolisme telles que des celles isoformes du cytochrome P450 et leurs interactions médicamenteuses, ainsi que pour établir la pertinence du modèle par rapport à l'homme. La cryoconservation permet de préserver une grande quantité d'hépatocytes fonctionnels. Les techniques de cryoconservation pour les hépatocytes sont principalement basées sur l'utilisation du diméthylsulfoxyde. Cependant, les analyses métaboliques des hépatocytes cryoconservés sont souvent limitées par la perte de l'intégrité fonctionnelle des hépatocytes suite au dégel. Il est donc nécessaire d'améliorer les techniques de cryoconservation. Nous avons développé une nouvelle technologie pour la cryoconservation de cellules mammifères basée sur un extrait de protéines de blé (WPE). Nous avons déterminé que l'utilisation de WPE pour la cryoconservation permet de maintenir plus efficacement l'activité des principales isoformes du cytochrome P450. Ceci a été réalisé en comparant les activités basales et inductibles des isoformes CYP1A1, CYP1A2, CYP2C6, CYP2D2 et CYP3A dans les hépatocytes de rat cryoconservés avec le WPE, comparativement aux cellules fraîches et celles cryoconservées avec le DMSO. Nous démontrons d'une manière concluante que les hépatocytes de rat cryoconservés avec du WPE maintiennent leur compétence métabolique et leur capacité de répondre aux inducteurs classiques de CYP, de façon similaire aux hépatocytes fraîchement isolés. Ces résultats démontrent clairement que le WPE est un excellent cryoprotecteur pour des hépatocytes de rat. C'est un produit naturel efficace, non-toxique, économique et un agent cryoprotecteur potentiellement universel supérieur au DMSO, qui lui possède des limitations dues à la toxicité cellulaire.

## 5.2 ABSTRACT

The drug discovery and development process requires adequate safety testing for drug toxicity before new drugs can be administered to patients. Hepatocytes are used *in vitro* to screen compounds for hepatotoxicity, induction of drug-metabolizing enzymes such as cytochrome P450 isoforms and drug-drug interactions, and to establish human relevance for metabolism. Cryopreservation makes it possible to preserve a large quantity of functional hepatocytes. Techniques for cryopreservation of hepatocytes are mainly based on dimethylsulfoxide. However, analyses of metabolic capacities of cryopreserved hepatocytes are often limited by loss of functional integrity of hepatocytes after thawing. It is therefore necessary to improve techniques of cryopreservation. We have developed a new cryopreservation technology for mammalian cells based on a wheat protein extract (WPE). We determined whether the WPE can better preserve activities of major cytochrome P450 isoforms, both in suspension and monolayer cultures of hepatocytes. This was achieved by comparing basal and inducible or metabolic activities of isoforms CYP1A1, CYP1A2, CYP2C6, CYP2D2 and CYP3A in rat hepatocytes that were cryopreserved with WPE, relative to fresh cells and those cryopreserved with DMSO. We conclusively demonstrate that rat hepatocytes cryopreserved with WPE retain their metabolic competency and their ability to respond to classical CYP inducers, when compared to freshly isolated hepatocytes. These findings clearly show that WPE are an excellent cryopreservant for rat hepatocytes. They are an efficient, non-toxic, economic natural product and universal cryoprotectant that is superior to DMSO, which has limitations due to cellular toxicity.

### 5.3 INTRODUCTION

The pharmaceutical industry is constantly developing new potential drug candidates for the treatment of a wide range of diseases. Adequate safety testing for drug toxicity is required by regulatory agencies (e.g. Food and Drug Administration (FDA)) before new drugs can be administered to patients. In addition to the parent drug, safety of drug metabolites must also be considered when conducting safety testing programs for new drug candidates. The liver is a major target of unacceptable human drug toxicity and is often responsible for withdrawal of drugs from clinical use, or their elimination late in the drug development process. About 20% of new drug candidates are removed from the drug development process as a consequence of unacceptable toxicity based on animal studies (Sistare et DeGeorge, 2007). Another major reason for failure of new drug candidates is adverse drug reactions (Uetrecht, 2006). In 1994, 2 million adverse drug reactions and 106,000 fatalities occurred in hospitalized patients in the US, representing an incidence of 6.7 and 0.32%, respectively (Lazarou et al., 1998).

Pharmaceutical *in vivo* testing is extremely expensive in terms of time and cost. Toxicology studies are usually conducted in animals as the basis for predicting potential human toxicities. However, there is concern about interspecies differences between animal models (e.g. rodents) and their relevance to the human context. Furthermore, current methods for assessing preclinical safety using laboratory animals often fail to detect target organ toxicity, which occurs in about 50% of cases for liver toxicity (Greaves et al., 2004). To improve the safety and efficiency of the drug discovery/development process in the future, it is important to develop improved technologies with human relevance for drug testing in preclinical trials (Sistare et DeGeorge, 2007). Detection of drug toxicity as early as possible would minimize the economic impact of withdrawing a drug late in the drug development process.

There is considerable interest in developing new and improved, physiologically based *in vitro* models for early drug toxicity screening, which adequately reflect the human *in vivo* situation. *In vitro* systems such as organ slices and primary cell models can be used to detect a variety of target organ toxicities. For liver toxicity, hepatocytes isolated from rodents, nonrodents and humans can be useful to screen compounds *in vitro* for induction of drug-metabolizing enzymes and drug-drug interactions and to establish human relevance for metabolism (O'Brien et Siraki, 2005; Sivaraman *et al.*, 2005). In fact, the human hepatocyte is the *in vitro* model which can produce a drug metabolic profile which is most similar to the human liver (Gomez-Lechon et al., 2003). However, the use of human hepatocytes is somewhat limited due to lack of availability and the high cost of commercially available sources. Cryopreservation offers a viable alternative to circumvent these problems.

Several methods for cryopreservation of hepatocytes have been developed and are mainly based on dimethylsulfoxide (DMSO) (Diener *et al.*, 1993). However, analyses of metabolic capacities of cryopreserved hepatocytes are often limited by loss of functional integrity of hepatocytes after thawing. Protocols for cryopreservation of hepatocytes were optimized by the addition of sugars, osmoregulators, antioxidants or caspase inhibitors (e.g. UW solution, CryoStor Cell Freezing Media) to increase post-thaw viability and to maintain functional activity for the majority of metabolic enzymes (Li et al., 1999). However, decreased attachment efficiencies of cryopreserved hepatocytes still remain an important problem and their responsiveness in culture to inducers of CYP isoenzymes requires improvement (Li et al., 1999). Drug metabolism studies involving CYP enzyme induction require prolonged culturing of hepatocytes as attached monolayers (Li, 2007). However, inherent problems with the rapid loss of CYP activity in fresh and cryopreserved hepatocytes still remain, when they are maintained as monolayer cultures. We recently reported the use of a plant protein extract (WPE) as a novel and non-toxic

cryoprotector which improved hepatospecific functions, compared to the DMSO standard (Hamel et al., 2006).

In this report, we extend our cryopreservation studies by characterizing the activities of 4 major CYP isoforms in thawed rat hepatocytes following cryopreservation with WPE. The activities of CYP450 isoforms allow a critical evaluation of the quality and metabolic capacity of cryopreserved cells upon thawing. We have determined whether the WPE can better preserve activities of CYP isoforms, both in suspension and monolayer cultures of hepatocytes. This was achieved by comparing basal and inducible or metabolic activities of isoforms CYP1A1, CYP1A2, CYP2C6, CYP2D2 and CYP3A in rat hepatocytes that were cryopreserved with WPE, relative to fresh cells and those cryopreserved with DMSO.



## 5.4 METHODS

### Chemicals

Collagenase, insulin, Williams' medium E (WME), DMSO, dexamethasone, phenobarbital, dextromethorphan, propidium iodide (PI) and other chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Leibovitz medium (L-15), gentamicin, MEM vitamins and Matrigel were from Gibco/Life Technologies (Burlington, ON). Fetal bovine serum (FBS) was from Mediacorp (Montreal, QC). 3-Cyano-7-ethoxycoumarin (CEC), 7-methoxy-4-(trifluoro-methyl)coumarin (MFC) and 3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium) ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) were purchased from BD Gentest (Mississauga, ON) and [3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]furan-2(5H)-one] (DFB) was offered generously by Merck Frosst (Montreal, QC) (Nicoll-Griffith et al., 2004).

### Plant Materials and Growth Conditions

Winter wheat genotype (*Triticum aestivum* L. cv Clair, LT<sub>50</sub> (lethal temperature that kills 50% of seedlings) -19°C) was used in this study. Wheat plants were grown and treated as previously described (Danyluk et al., 1998). Briefly, plants were grown for 10 days under a 16 hour/day photoperiod with a light intensity of 250 µmol/m<sup>2</sup>s at 20°C.

### Total Protein Extraction

The aerial parts of seedlings were collected and blended until a homogeneous solution was obtained with cold ultrapure water. The homogenate was filtered through three layers of miracloth and centrifuged at 30,000g for 45 min at 4°C. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 and sterilized using a 0.22 µm filter. The extract was concentrated by freeze drying and stored at -20°C. The dried powder

extract was resuspended in ice-cold WME medium before being added to the hepatocyte suspension (Hamel et al., 2006).

### **Hepatocyte Isolation**

Hepatocytes were isolated from male Sprague–Dawley rats (140–180g) (Charles River Canada, Saint-Constant, QC), by the two-step collagenase digestion technique (Guillemette *et al.*, 1993; Seglen, 1976). Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (Olfert et al., 1993) for care and use of experimental animals. Cell viability was evaluated by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON) with 2  $\mu$ M PI (Reader et al., 1993).

### **Cryopreservation of Hepatocytes**

Immediately after isolation, the hepatocyte suspension ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was added to ice-cold WME medium supplemented with 10% FBS and 60 mg of WPE in cold cryovials. Positive (15% DMSO and 50% FBS) and negative (WME) controls were also prepared. Cells in cryovials were frozen at a cooling rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  in a controlled freezing container (Nalgene, Rochester, NY) to  $-80^{\circ}\text{C}$  for 1 day, and then transferred to liquid nitrogen for 7 days (Hamel et al., 2006).

### **Thawing of Cryopreserved Hepatocytes**

Frozen cells were thawed quickly by gentle agitation in a  $37^{\circ}\text{C}$  water-bath and viability was determined with 2  $\mu$ M PI (70–80%). Immediately after thawing, the hepatocyte suspension was diluted 10-fold with cold WME medium. After centrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 50xg, 2 min), hepatocytes were suspended in 10 mL of WME medium and washed twice. After washing, dead cells were removed by 30% isotonic Percoll centrifugation. Recovery of cells after this step was 85%. The viability of rat hepatocytes following cryopreservation with WPE was significantly higher ( $P < 0.05$ )

at  $72.15 \pm 1.35\%$ , compared to  $66.93 \pm 2.25\%$  for DMSO. For fresh cells, viability was  $92.67 \pm 2.89\%$ . Post-thaw viability was very low in negative (WME) controls (1.6%).

For tests in suspension, hepatocytes were adjusted to  $1 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L. For monolayer cultures, hepatocytes ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) were plated in 4-well Corning plastic tissue culture plates, noncoated or coated with Matrigel, in WME medium supplemented with insulin (0.2 mg/mL) and gentamicin (50 mg/mL) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. After 3 h, medium was changed and cells were incubated overnight in L-15 medium supplemented with insulin and gentamicin.

### **Cellular Morphology**

Morphology of hepatocytes, in regular plastic tissue culture plates or in those coated with Matrigel, was evaluated by microscopy (Carl Zeiss Ltd., Montreal, QC). Photographs were taken by digital camera (Camera CCD, Sony DXC-950P; Empix Imaging, Inc., Mississauga, ON) and images were analyzed using Northern Eclipse software.

### **Viability**

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in the medium of seeded, adherent hepatocytes (Moldeus et al., 1978). The hepatocyte culture medium was removed and activity of LDH released into the medium from adherent cells was quantified. The total amount of LDH activity was obtained by lysis of live cells with 10% Triton X-100 (Moffatt et al., 1996). Attachment efficiency was evaluated by LDH activity in freshly isolated and attached cryopreserved hepatocytes after 24 h in culture.

### **Enzymatic Activity of CYP Isoforms**

The basal enzymatic activities were measured in hepatocyte suspensions immediately post-thaw. For induction of CYP activities, hepatocytes were cultured for 24 h and then treated for 48 h with benzo-[a]-pyrene (10  $\mu$ M, CYP 1A1), phenobarbital (50  $\mu$ M, CYP 2C6), or dexamethasone (50  $\mu$ M, CYP 3A1/2). Dextromethorphan (50  $\mu$ M) was used as a metabolic substrate for CYP 2D2. Cells were washed twice with PBS to remove these compounds. CYP activities were measured using fluorescent substrates for CYP450 isoforms 1A1/2 (CEC, ex: 410nm, em: 450nm), 2D2 (AMMC, ex: 410nm, em: 450nm), 2C6 (MFC, ex: 410nm, em: 500nm) and 3A1/2 (DFB, ex: 340nm, em: 450nm). Cells were incubated with 25  $\mu$ M of different substrates for different times between 0 and 30 min. After the incubation, 150  $\mu$ L of cell suspension was added to 150 $\mu$ L of acetonitrile, or 60% acetonitrile with 40% Tris base (pH 10, DFB). Fluorescence was detected using a spectrofluorimeter (SPECTRAFluor Plus, Tecan, CA).

### **Statistical Analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three replicate dishes for each condition with a minimum of three experimental repeats using different cell preparations from separate animals. Comparison between groups and analysis for differences between means of control and treated groups were performed using ANOVA followed by the post hoc test Newman-Keuls ( $P < 0.05$ ). The threshold for statistical significance was:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), and  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 5.5 RESULTS

### **Cellular Morphology of Rat Hepatocytes Cryopreserved with WPE**

It is widely recognized that cellular adherence is disturbed in cryopreserved cells upon thawing (Terry et al., 2006a). Consequently, we evaluated whether cryopreservation with WPE could improve the cellular morphology of hepatocytes following thawing. Freshly isolated hepatocytes exhibited pronounced differences in morphology, depending on whether they were cultured on regular plastic dishes or on Matrigel-coated dishes (Fig. 1). Fresh cells exhibited a spread-out phenotype on the plastic surface, when compared to cryopreserved cells. However, when cultured on Matrigel, fresh cells rolled together and formed three dimensional spheroids. When hepatocytes were cryopreserved with WPE or DMSO, they were still much rounder than fresh cells. The cryopreserved cells did not form spheroids on Matrigel, in contrast to freshly isolated cells. However, cells that were cryopreserved with WPE did appear to form small colonies of cells, more so than cells that were cryopreserved with DMSO. Cryopreservation with WPE improved the morphology of hepatocytes to some extent compared to those cryopreserved with DMSO. However, the rounded morphology was still quite different from that of fresh cells. Attachment efficiencies for cells that were cryopreserved with WPE and DMSO were similar with values of  $50.9 \pm 2.9\%$  and  $50.3 \pm 4.1\%$ , respectively, relative to fresh hepatocytes, as reference control (100%).

### **Basal Activities of Cytochrome P450 Isoforms in Cryopreserved Hepatocytes**

The activities of CYP450 isoforms are one of the most unstable functions in isolated hepatocytes (Grant et al., 1985; Paine, 1990) and are highly sensitive to changes in cellular environment. For example, activities of P450 isoforms such as CYP1A2 and CYP3A4 decrease by approximately 50% per day in culture (Li, 2007). We therefore

determined whether the activities of 4 major CYP isoforms would remain at levels comparable to fresh cells, in suspension and monolayer cultures of rat hepatocytes that were cryopreserved with WPE.

The basal activities of CYP3A1/2 and CYP2D2 were similar in both WPE-cryopreserved and freshly isolated hepatocytes (Fig. 2A, B). However, for hepatocytes that were cryopreserved with DMSO, the enzymatic activities of isoforms CYP3A1/2 and CYP2D2 were decreased by at least 50% (Fig. 2A, B), when compared to fresh hepatocytes. For CYP1A1/2 and CYP2C6, basal activities in hepatocytes that had been cryopreserved with WPE or DMSO were similar and slightly higher than those in fresh cells (Fig. 2C, D). These data show that cryopreservation of hepatocytes with WPE is advantageous when compared to DMSO.

### **Induction of Cytochrome P450 Isoforms**

Fresh and thawed cryopreserved hepatocytes were maintained in culture during 3 days, either in plastic or Matrigel-coated dishes. Subsequently, the induction or metabolic activity of the 4 CYP isoforms was determined in hepatocytes that had been cryopreserved with WPE, compared to fresh cells and those cryopreserved with DMSO.

#### **A. Regular Plastic Dishes**

For isoforms CYP3A1/2, basal activity after 3 days in culture was lower for cryopreserved cells, when compared to fresh hepatocytes (Fig. 3A). After induction with dexamethasone, CYP3A1/2 activity was also lower for cryopreserved cells, compared to fresh cells (Fig. 3A). However, induced CYP3A1/2 activity was higher

in hepatocytes that were cryopreserved with WPE, compared to DMSO. The induction of enzymatic activity (induced/non-induced: (I/NI)) for fresh cells (2.08, 30 min) and those cryopreserved with WPE (2.02) was similar (Fig. 3B), whereas it was lower for cells cryopreserved with DMSO (1.69).

The basal activity of isoform CYP2D2 after 3 days in culture was higher for hepatocytes that were cryopreserved with DMSO, than for fresh cells and those cryopreserved with WPE (Fig. 4A). CYP2D2 activity was increased by dextromethorphan in fresh and WPE-cryopreserved cells (Fig. 4A), whereas it decreased in cells that were cryopreserved with DMSO. The increase in enzymatic activity for fresh and WPE-cryopreserved cells was similar (4.57, 15 min) (Fig. 4B), whereas that for cells cryopreserved with DMSO was much lower (0.41, 15 min).

For the isoforms CYP1A1/2, the basal activities after 3 days in culture were similar for cryopreserved cells, but lower than in fresh hepatocytes (Fig. 5A). After induction with benzo[a]pyrene, the levels of CYP1A1/2 activity were higher for hepatocytes that were cryopreserved with WPE, compared to DMSO, but lower than in fresh cells. The induced enzymatic activities for cells that were cryopreserved with DMSO (24.31, 15 min) and WPE (22.29) were higher than for fresh hepatocytes (17.68) (Fig. 5B).

For hepatocytes that were cryopreserved with WPE, basal activity for the isoform CYP2C6 after 3 days in culture was similar to fresh hepatocytes after 15 min, but slightly lower after 30 min (Fig. 6A). However, activity was lower for cells cryopreserved with DMSO, when compared to WPE. After induction with phenobarbital, CYP2C6 activity showed the same trend as for basal activity (Fig. 6B). The induced enzymatic activities for fresh (4.56, 15 min) and WPE-cryopreserved hepatocytes (4.41, 15 min) were similar, whereas that for DMSO-cryopreserved cells was lower (3.39) (Fig. 6B).

In general, the rates of induction of activities for the CYP isoforms were similar when fresh hepatocytes and those cryopreserved with WPE were cultured for 3 days in regular plastic dishes. Apart from CYP1A1/2, they were consistently lower in cells that had been cryopreserved with DMSO.

### **B. Matrigel-coated Dishes**

There was a general increase in activities of the 4 cytochrome P450 isoforms for fresh and cryopreserved cells when cultured on Matrigel-coated dishes (Figs. 3-6, panels C,D), compared to regular plastic dishes (Figs. 3-6, panels A,B).

For the CYP3A1/2 isoforms, the basal activities and rates of induction of activity, after 3 days of culture on Matrigel-coated dishes (Fig. 3C, D), were qualitatively similar to those observed for hepatocytes that were cultured in regular plastic dishes (Fig. 3A, B). The only difference was that activities and induced activities were approx. 2-fold higher for hepatocytes that had been cultured on Matrigel. The induced enzymatic activities for cells that were cryopreserved with WPE (4.21, 5 min) were again similar to fresh hepatocytes (4.54) and higher than for those cryopreserved with DMSO (3.3) (Fig. 3D).

The basal activities of the isoform CYP2D2 after 3 days of culture on Matrigel matrix were similar for cryopreserved and fresh hepatocytes (Fig. 4C). When cells were treated with dextromethorphan, metabolic activities for CYP2D2 were also similar after 15 min, but after 30 min, activity in fresh cells was higher than for the other cell types (Fig. 4C). The increases in enzymatic activities were similar for fresh and WPE-cryopreserved cells (4.85 and 5.10, 15 min), but higher than for those cryopreserved with DMSO (4.19) (Fig. 4D). However, in contrast to culture on plastic dishes, the activity of CYP2D2 was restored when DMSO-cryopreserved hepatocytes were cultured on Matrigel surfaces (Fig. 4B, D).



The basal activities of isoforms CYP1A1/2 were similar for cryopreserved and fresh hepatocytes, after 3 days of culture on the Matrigel matrix (Fig. 5C). After induction with benzo[a]pyrene, CYP1A1/2 activity was lower in cells that were cryopreserved with WPE, when compared to fresh hepatocytes, but still higher than for those cryopreserved with DMSO (Fig. 5C). The induced enzymatic activity for cells cryopreserved with WPE (42.43, 15 min) was similar to that of fresh hepatocytes (39.21), but again higher than for those cryopreserved with DMSO (31.76) (Fig. 5D).

For isoform CYP2C6, the basal and phenobarbital-induced activities, after 3 days of culture on Matrigel-coated dishes (Fig. 6C), were qualitatively similar to those observed for hepatocytes that were cultured in uncoated dishes (Fig. 6A). The induced enzymatic activities for fresh (5.29) and cryopreserved hepatocytes (WPE, 4.93; DMSO, 5.28) were similar (Fig. 6D).

These results show that the culture of fresh and cryopreserved hepatocytes on Matrigel-coated dishes improves the basal and induced or metabolic activities of the 4 CYP isoforms. There was a notable improvement in activity of CYP2D2 for DMSO-cryopreserved cells that were cultured on Matrigel matrix, compared to uncoated surfaces. Again, when hepatocytes were cultured for 3 days in Matrigel-coated dishes, the induced or metabolic activities of the 4 CYP isoforms in fresh and WPE-cryopreserved hepatocytes were similar, whereas they were generally lower in cells cryopreserved with DMSO. Together, these findings demonstrate that cryopreservation of hepatocytes with WPE is clearly advantageous and comparable to fresh hepatocytes, in terms of preserving activities of the 4 major CYP isoforms, when compared to the DMSO standard.

## 5.6 DISCUSSION

We previously reported that WPE is an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes (Hamel et al., 2006). Cryopreservation of hepatocytes with WPE retained adequate viability, attachment efficiencies, hepatospecific functions such as albumin secretion and biotransformation of ammonium to urea, and capacity to respond to inducers of CYP1A1 and CYP2B (Hamel et al., 2006). The significant new findings in this study are that, upon thawing, the activities of 4 major drug-metabolizing enzymes of the cytochrome P450 family are similar in rat hepatocytes that were cryopreserved with WPE and freshly isolated cells. When cells cryopreserved with WPE were cultured as attached monolayers for 3 days upon thawing, metabolic activities of the CYP isoforms 3A1/2, 2D2 and 2C6 in response to classical CYP inducers were equivalent to those in fresh hepatocytes, but slightly higher for CYP1A1/2. Basal enzymatic activities of the 4 CYP isoforms were similar in suspensions of fresh and WPE-cryopreserved hepatocytes.

The drug discovery process utilizes hepatocytes in suspension and in monolayer cultures. Due to their limited lifespan (approx. 5h), suspension cultures of hepatocytes can be used for applications in the early drug discovery process such as hepatic metabolic stability, P450 inhibition and drug transporter activities (Li, 2007). However, P450 induction studies remain the 'gold standard' for detecting drug-drug interactions, which are required by the FDA. The evaluation of P450 induction requires the use of monolayer cultures of hepatocytes («plateable» hepatocytes) that can be maintained in culture for 2 to 3 days. Cryopreservation with WPE could be a valuable tool in drug discovery since hepatocytes retained activity of the 4 CYP isoforms both in suspension and in monolayer culture.

Our findings show that the activities of the 4 CYP isoforms were markedly increased when cryopreserved and fresh hepatocytes were cultured on dishes pretreated with an

attachment substrate such as Matrigel. The Matrigel matrix is a basement membrane preparation which contains extracellular matrix proteins such as laminin, collagen IV and entactin. It provides a physiologically relevant environment which better reflects the *in vivo* context. For culture on Matrigel, activities of the 4 CYP isoforms were similar in fresh cells and those cryopreserved with WPE, whereas they were lower in cells cryopreserved with DMSO, with the exception of CYP2C6.

There were marked differences in morphology when hepatocytes were cultured on Matrigel matrix versus plastic surfaces. Differences were more pronounced for fresh than cryopreserved hepatocytes. However, hepatocytes that were cryopreserved with WPE or DMSO maintained a rounded morphology on both plastic and Matrigel surfaces. An important point is that the rounded morphology did not affect responses of cells that had been cryopreserved with WPE to classical CYP inducers.

The attachment efficiencies of hepatocytes that had been cryopreserved with WPE or DMSO were 50% compared to freshly isolated hepatocytes, when cultured as monolayers on both plastic and Matrigel-coated surfaces. One of the major limitations of hepatocyte cryopreservation is that low attachment efficiencies are obtained upon thawing (Li, 2007; Li *et al.*, 1999). Attachment efficiencies for DMSO-cryopreserved hepatocytes from various animal species are generally in the range of 50%, compared to fresh cells (Chesne et Guillouzo, 1988; Chesne *et al.*, 1993). Attachment efficiencies are even lower (5-40%) for «plateable» cryopreserved human hepatocytes (Terry *et al.*, 2006c; Zvibel *et al.*, 2002). This is a major problem since cell adhesion and cell-cell contacts have an impact on metabolic activities and functional integrity of hepatocytes. Despite the low attachment efficiencies, cryopreserved rat hepatocytes can still be cultured as reliably as freshly isolated hepatocytes. Several studies have shown that rat, mouse and human hepatocytes can retain adequate viability and metabolic competency following cryopreservation with DMSO (de Sousa et al., 1996; Guillouzo et al., 1999).

Our findings show that the induced or metabolic activities of CYP450 isoforms in cells that were cryopreserved with WPE were consistently similar to those observed in freshly isolated hepatocytes. However, induction of CYP activity in cells cryopreserved with DMSO was equivalent or slightly lower, compared to WPE or fresh cells. Our findings suggest that WPE is a more suitable cryopreservant for primary hepatocyte cultures than DMSO.

Activities of the phase II enzymes, UDP-glucuronosyl S-transferases (UGT) and sulphotransferases, were well preserved in rat hepatocytes that were cryopreserved with DMSO (Hewitt et Utesch, 2004). On the other hand, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities of cryopreserved human hepatocytes were reduced to less than 40% of the enzyme activity of fresh hepatocytes (Coundouris et al., 1993). Drug transporter activities were also well preserved in cryopreserved rat hepatocytes (Houle et al., 2003). Cytochrome P450 enzymes such as CYP3A, CYP2C and CYP2D were generally well preserved in hepatocytes following cryopreservation with DMSO (de Sousa *et al.*, 1996; Hengstler *et al.*, 2000a; Hengstler *et al.*, 2000b; Hewitt et Utesch, 2004; Houle *et al.*, 2003; Shaddock *et al.*, 1993). However, CYP2C activity (tolbutamide hydroxylase activity) in suspensions of cells that were cryopreserved with DMSO was lower, compared to fresh cells (Hewitt et Utesch, 2004). It was reported that low temperatures can induce conformational changes in the structure of CYP450 (Nardid et al., 1997).

Cryopreserved hepatocytes are often less responsive to enzyme-inducing agents than fresh hepatocytes (Terry et al., 2006a). Rifampicin induced testosterone metabolism by 4.5-fold in fresh hepatocytes, but only 2-fold in cryopreserved cells (Reinach et al., 1999). Previous studies reported that hepatocytes were responsive to CYP1A and CYP3A inducers following cryopreservation with DMSO (Reinach et al., 1999; Silva

et al., 1999). However, the specific activity, after induction, was lower than in freshly isolated cells.

Classical agents such as DMSO are used to protect cells from dehydration caused by the formation of intracellular ice during cryopreservation and minimise potential damage due to osmotic imbalance. However, DMSO causes membrane damage and is toxic to hepatocytes, particularly at temperatures such as 25°C and 37°C, and must be removed rapidly from contact with cells during post-thaw processing (Terry et al., 2006b). DMSO causes structural and metabolic impairment of hepatocytes and compromises their ability to respond to enzyme-inducing agents and hormones (Diener *et al.*, 1993). Therefore, hepatocytes cryopreserved with DMSO do not display the metabolic state of fresh cells, and their use can lead to erroneous interpretation of results. It is therefore important to develop non-toxic alternatives to replace DMSO as a cryopreservation agent, particularly for sensitive cell types such as hepatocytes.

We previously demonstrated that cryoprotective activity appears to be specific to proteins in wheat extracts, since other proteins such as bovine serum albumin (BSA), *E. coli* proteins, or fetal bovine serum (FBS) did not show any cryoprotective activity in hepatocytes (Hamel et al., 2006). However, the cryoprotective activity of proteins in extracts from other types of plants cannot be ruled out.

The higher cryopreservation capacity of WPE compared to DMSO is probably explained by protective effects of WPE against cryopreservation-induced degradation of membrane proteins by unknown processes. Overwintering plants such as the hardy winter wheat genotype (*Triticum aestivum* L. cv Clair) accumulate protective compounds that ensure survival of the plant during freezing. These protective compounds include sugars (glucose, fructose, sucrose, trehalose), antioxidants, amino acids and proteins such as antifreeze proteins and dehydrins. These proteins have the

potential to protect cells against dehydration caused by freezing. The wheat proteins may agglutinate at the plasma membrane, thus decreasing the aqueous flow whose regulation is very important in order to minimize degradation and avoid the loss of viability. These proteins may also protect cells against damage by stabilizing proteins and membranes during freezing.

This study conclusively demonstrates that rat hepatocytes cryopreserved with WPE retain their metabolic competency and their ability to respond to classical CYP inducers upon thawing, when compared to freshly isolated hepatocytes. Viability and CYP metabolic studies were also carried out using hepatocytes from different rats that were cryopreserved with different lots of WPEs for longer periods of time, ranging from several months up to a maximum of 4 years. Similar data were obtained whether hepatocytes were cryopreserved for 7 days, several months or 4 years (data not shown). These findings clearly show that WPE is an excellent cryopreservant for long-term storage of primary hepatocytes. They are an efficient, non-toxic, economic natural product and universal cryoprotectant that is superior to DMSO, which has limitations due to cellular toxicity. This technology is highly relevant to the drug discovery process and is currently being validated in human hepatocytes. During recent years, hepatocytes isolated from unused donor livers are being used for clinical transplantation in patients with acute liver failure and liver-based metabolic defects. Development and optimization of cryopreservation protocols for human hepatocytes will provide a solution to increase the availability of hepatocytes with good thawed function for their use in transplantation (Terry et al., 2006a).

### **Acknowledgments**

The authors thank Michel Marion and Denis Flipo for technical assistance.

## 5.7 LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Cellular morphology of rat hepatocytes cryopreserved with WPE

Cellular morphology was visualized 24 h after seeding thawed rat hepatocytes on either regular plastic dishes or Matrigel-coated dishes, following cryopreservation for 7 days in WME 10% FBS supplemented with 15% DMSO and 50% FBS (DMSO) or with 60 mg of WPE (WPE). Freshly isolated hepatocytes (FRESH) served as reference. Hepatocytes ( $250 \times 10^3$ ) were visualized by microscopy (Magnification 100X). Photographs are from one representative experiment, which was repeated at least three times.

Figure 2: Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in rat hepatocytes cryopreserved with WPE: comparison with DMSO-cryopreserved and fresh cells

Enzymatic activity of 4 cytochrome P450 isoforms was evaluated using fluorescent probes in cell suspensions immediately post-thaw. A) CYP3A1/2: DFB B) CYP2D2: AMMC, C) CYP1A1/2: CEC and D) CYP2C6: MFC. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Figure 3: Effect of cryopreservation of rat hepatocytes with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP3A1/2

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO) or 60 mg of WPE. Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Dexamethasone was then used to induce CYP activity during 48h. Enzymatic activity of CYP3A1/2 was evaluated using DFB for hepatocytes in culture on regular plastic dishes and expressed as A) relative fluorescence and B) induced/non-induced activity. C) Relative fluorescence and D)

induced/non-induced (I/Ni) activity are shown for cells in culture on Matrigel-coated dishes. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure 4: Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2D2 in hepatocytes cryopreserved with WPE

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO) or 60 mg of WPE. Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Dextromethorphan (Dextro) was then used to increase metabolic activity during 48h. Enzymatic activity of CYP2D2 was evaluated using AMMC for hepatocytes in culture on regular plastic dishes and expressed as A) relative fluorescence and B) enzymatic activity (dextro/no dextro). C) Relative fluorescence and D) enzymatic activity (dextro/no dextro) are shown for cells in culture on Matrigel-coated dishes. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure 5: Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP1A1/2 in cryopreserved rat hepatocytes: effects of WPE

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with 15% DMSO and 50 % FBS (DMSO) or 60 mg of WPE. Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Benzo-[a]-pyrene was then used to induce CYP activity during 48h. Enzymatic activity of CYP1A1/2 was evaluated using CEC for hepatocytes in culture on regular plastic dishes and expressed as A) relative fluorescence and B) induced/non-induced activity. C) Relative fluorescence and D)



induced/non-induced activity are shown for cells in culture on Matrigel-coated dishes. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) hepatocytes were cultured for 72h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure 6: Effects of cryopreservation with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2C6

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO) or 60 mg of WPE. Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Phenobarbital was then used to induce CYP activity during 48h. Enzymatic activity of CYP2C6 was evaluated using MFC for hepatocytes in culture on regular plastic dishes and expressed as A) relative fluorescence and B) induced/non-induced activity. C) Relative fluorescence and D) induced/non-induced activity are shown for cells in culture on Matrigel-coated dishes. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

## 5.8 FIGURES

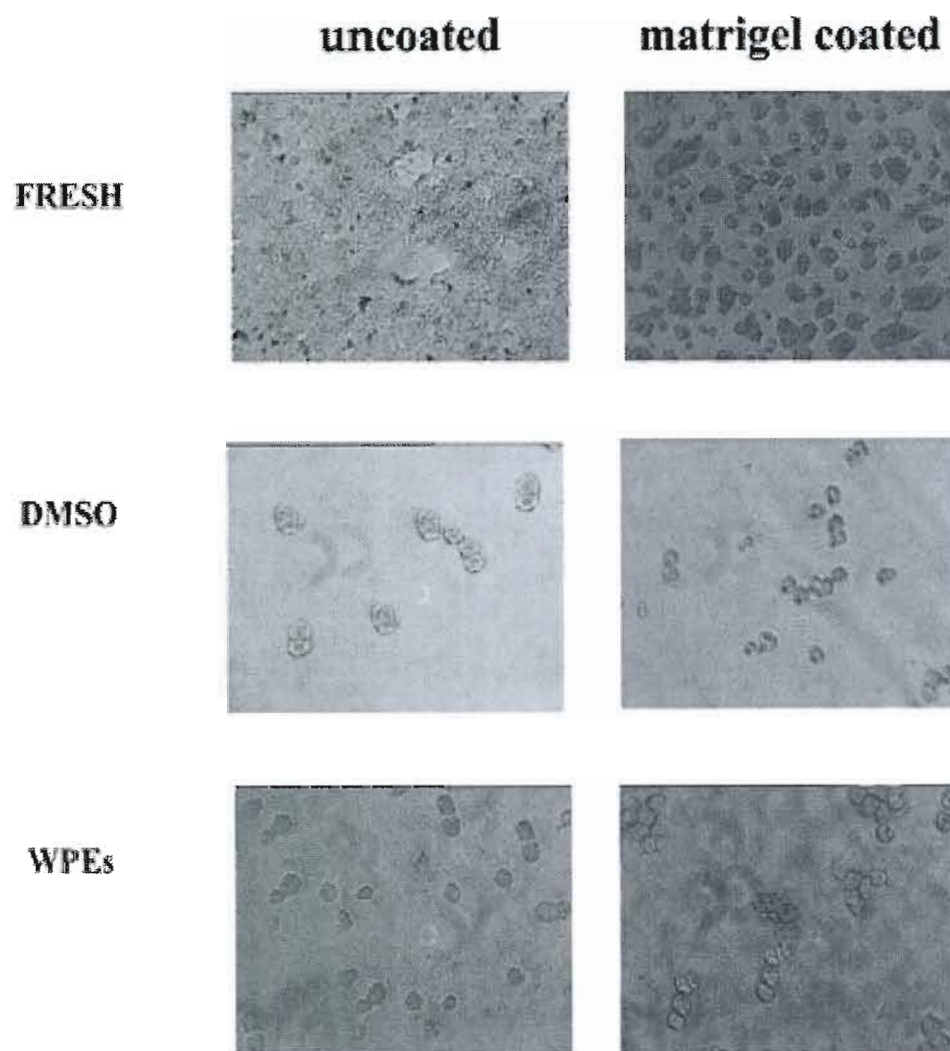
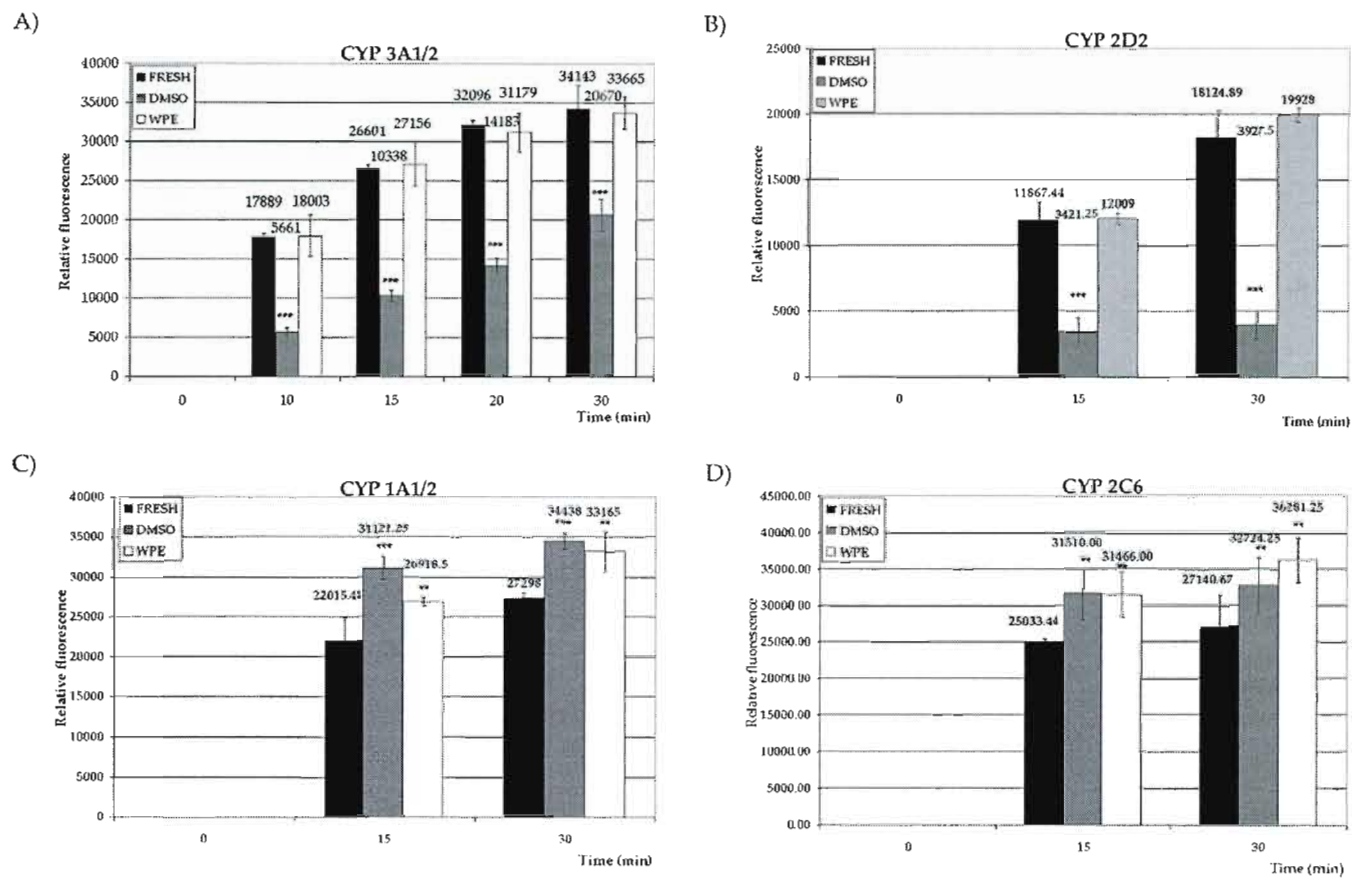
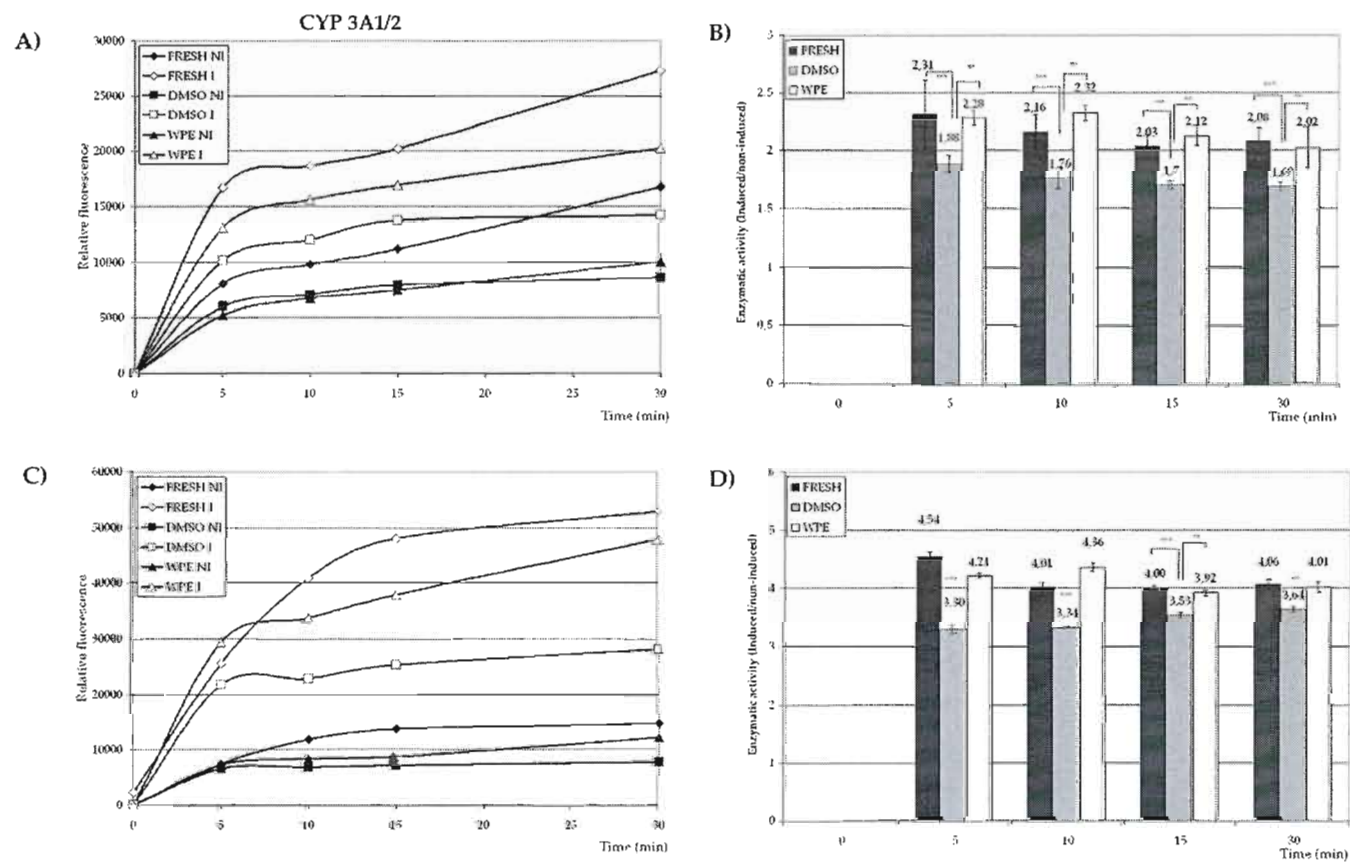


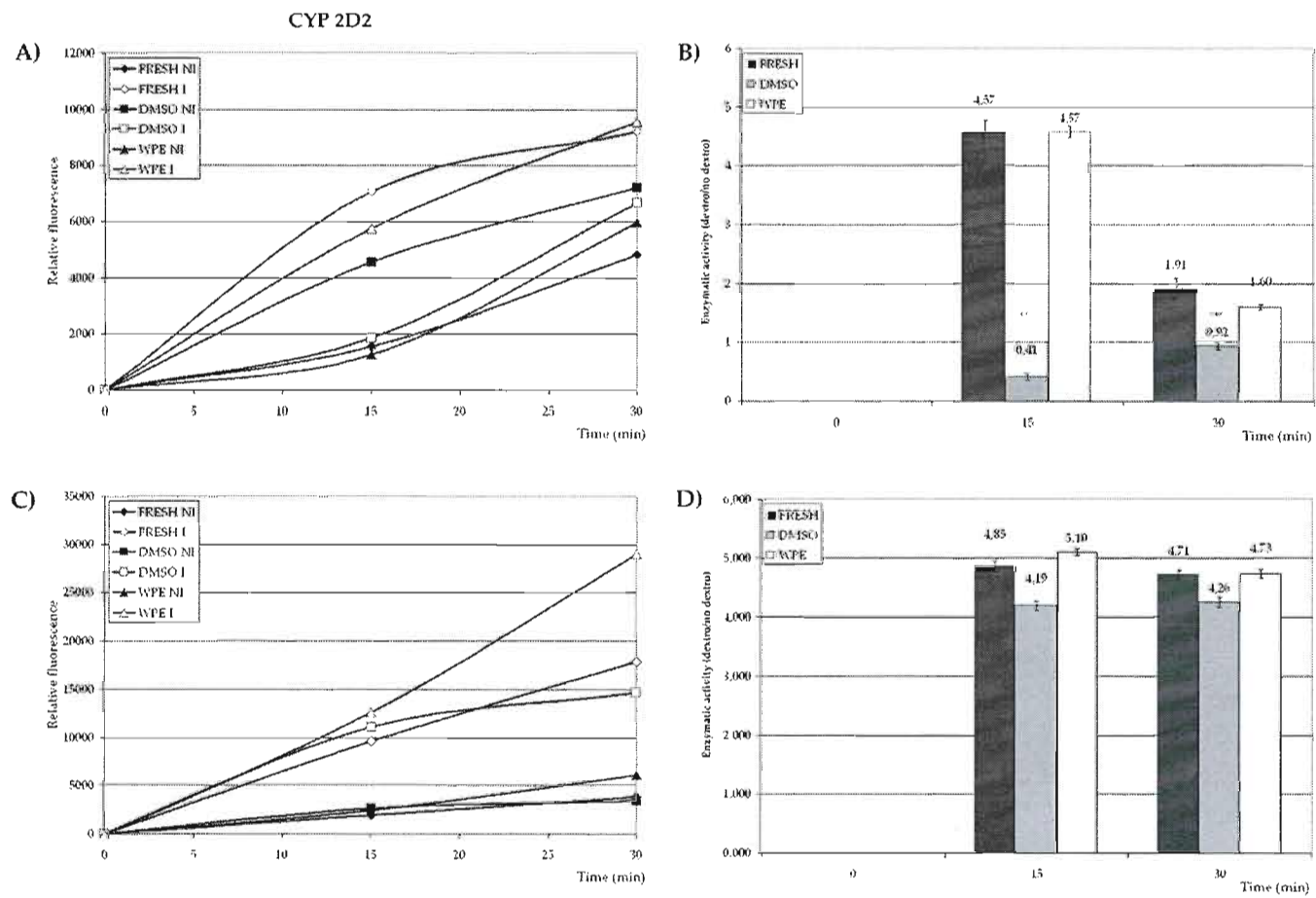
Figure 1 Cellular morphology of rat hepatocytes cryopreserved with WPE



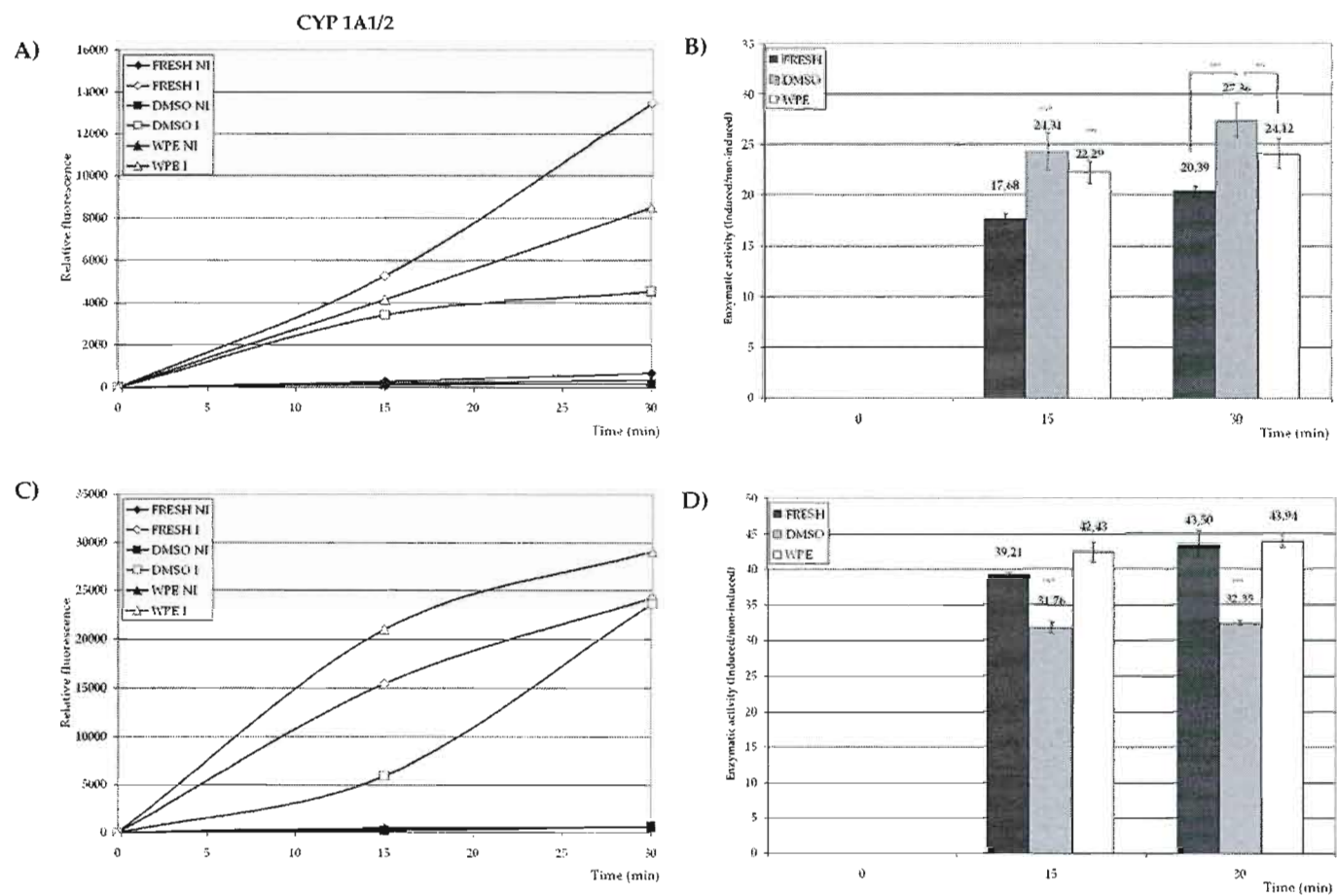
**Figure 2** Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in rat hepatocytes cryopreserved with WPE: comparison with DMSO-cryopreserved and fresh cells



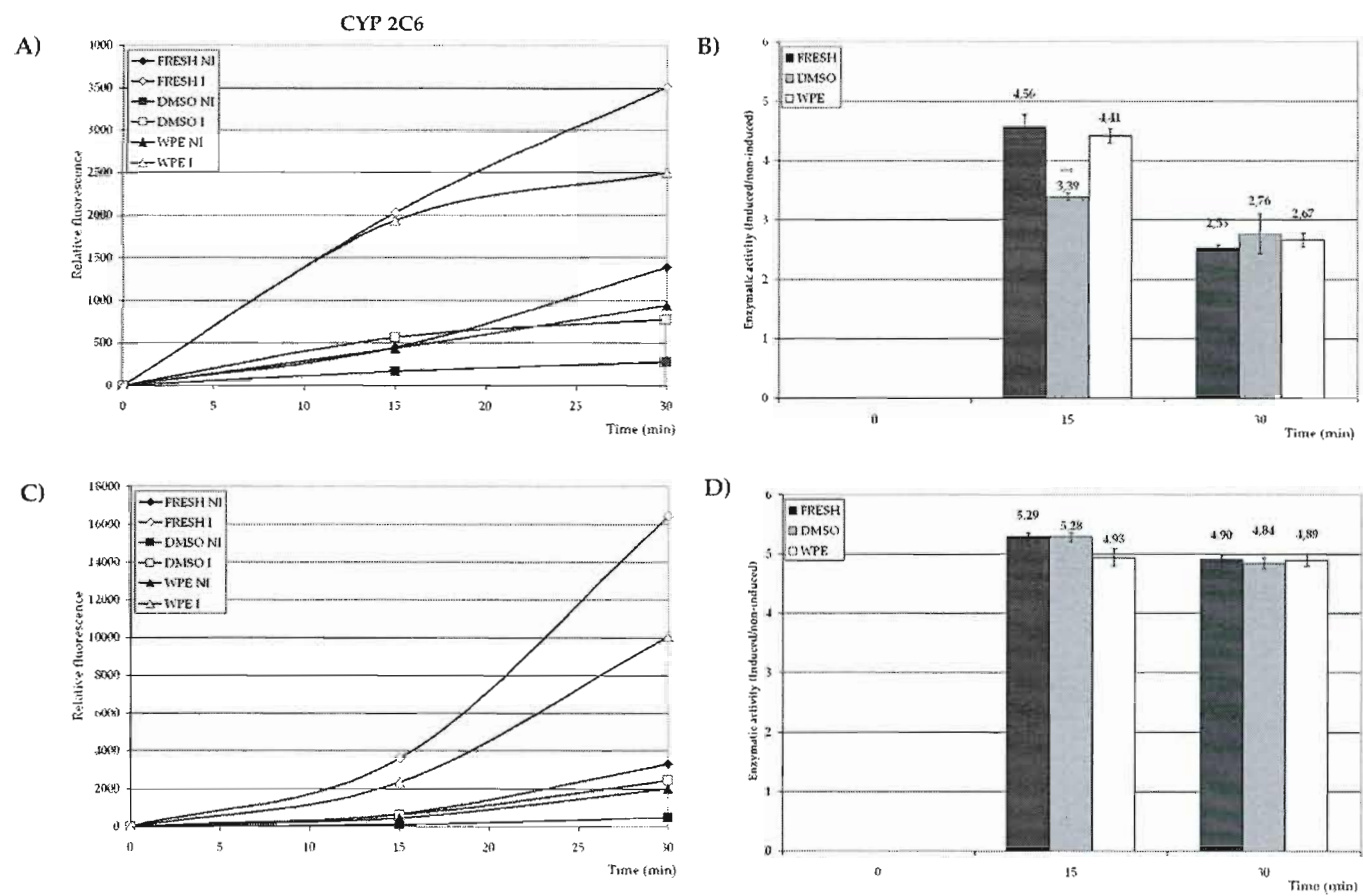
**Figure 3** Effect of cryopreservation of rat hepatocytes with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP3A1/2



**Figure 4** Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2D2 in hepatocytes cryopreserved with WPE



**Figure 5** Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP1A1/2 in cryopreserved rat hepatocytes: effects of WPE



**Figure 6** Effects of cryopreservation with WPE on metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP2C6

## **CHAPITRE VI**

### **WHEAT PROTEINS ENHANCE STABILITY AND FUNCTION OF ADHESION MOLECULES IN CRYOPRESERVED HEPATOCYTES**



Wheat proteins enhance stability and function of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes

Mélanie Grondin, Francine Hamel, Diana A. Averill-Bates and Fathey Sarhan

Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,  
Succursale Centre-ville,  
Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

Corresponding author: Dr Fathey Sarhan  
Université du Québec à Montréal  
Département des Sciences biologiques  
C.P. 8888, Succursale Centre-ville  
Montréal, Québec H3C 3P8  
Canada  
Telephone : (514) 987-3000, ext. 3363  
Fax : (514) 987-4647  
E-mail : sarhan.fathey@uqam.ca

**Running head:** Wheat proteins cryoprotect adhesion molecules

Financial support was provided by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awarded to FS and DAB.

**Keywords :** Cryopreservation, hepatocytes, wheat proteins, E-cadherin,  $\beta$ 1-integrin,  $\beta$ -catenin

**List of Abbreviations:** WME: William's Media, DMSO: dimethyl sulfoxide, PI: propidium L-15: Leibovitz medium, FBS: Fetal bovine serum, WP: Wheat protein, SulWPE: WPs partially fractionated by ammonium sulfate precipitation, AcWPE: WPs partially fractionated with acetone, IPTG: isopropyl  $\beta$ -1-thiogalactopyranoside, LDH: lactate dehydrogenase, BSA: bovine serum albumin, ALF: acute liver failure, L-CAM: liver cell adhesion molecule, ECM: extracellular matrix

\* par souci pour l'environnement les références ne seront citées qu'à la fin de la thèse

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilités spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Mélanie Grondin : rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, mise au point des protocoles, conceptualisation des manipulations en regard de notre problématique, préparation des extraits.

Francine Hamel : participation à la mise au point des protocoles et conceptualisation des manipulations.

Diana Averill-Bates : rédaction

Fathey Sarhan : rédaction, encadrement et participation à la planification de l'expérimentation

## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé: Wheat protein enhance stability and function of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes

Soumis pour publication ☐, accepté pour publication ☒ ou publié dans : Cell Transplantation (CT-1903)

Auteur principal est:

Mélanie Grondin



Signature

18-7-08

Date

ate

Directeur de recherche :

Fathey Sarhan



Signature

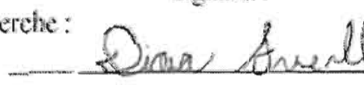
28-07-08

Date

ate

Co-Directeur de recherche :

Diana Averill-Bates



Signature

18-07-08

Date

ate

## 6.1 RÉSUMÉ

Les hépatocytes cryoconservés maintenant de bonnes fonctions hépatospécifiques lors du dégel sont importants pour la transplantation clinique et pour les essais *in vitro* de toxicité des médicaments. Cependant, la cryoconservation réduit la viabilité et certaines fonctions hépatospécifiques, dont le changement le plus prononcé est la diminution de l'efficacité d'attachement des hépatocytes. L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et les contacts cellule-cellule sont cruciaux pour plusieurs aspects de la fonction cellulaire. Ces processus sont en partie régulés par les molécules d'adhésion cellulaires. Les mécanismes responsables de la réduction de l'efficacité d'attachement des hépatocytes cryoconservés ne sont pas bien élucidés. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'effet d'un nouveau procédé de cryoconservation, en utilisant les protéines de blé (WPs) ou des protéines recombinantes associées à la tolérance au gel chez le blé, sur la stabilité de trois molécules d'adhésion importantes (intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine et  $\beta$ -caténine). Les analyses d'immunofluorescence et d'immunobuvardage indiquent que les niveaux des intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine et  $\beta$ -caténine sont beaucoup plus faibles chez les hépatocytes de rat cryoconservés, comparativement aux cellules fraîches. L'expression des molécules d'adhésion est généralement inférieure chez les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO, comparativement au WPs. D'ailleurs, la stabilité de chaque molécule d'adhésion n'est pas affectée par la cryoconservation au même degré, des diminutions plus prononcées se produisent pour l'intégrine  $\beta 1$  (62-74-%) et la  $\beta$ -caténine (51-58%) que pour la E-cadhérine (21-37%). Cependant, quand les hépatocytes sont cryoconservés avec les WPs partiellement purifiées (SulWPE, AcWPE) ou des protéines recombinantes, il y avait un effet protecteur clair contre la perte d'expression des protéines intégrine  $\beta 1$ ,  $\beta$ -caténine et E-cadhérine. L'expression est seulement inférieure de 10 à 20% comparativement aux hépatocytes frais. Ces résultats démontrent clairement que le WP, et en particulier, les WPs partiellement purifiées et les protéines recombinantes, sont plus efficaces pour la cryoconservation des hépatocytes de rat en maintenant une bonne expression des molécules d'adhésion. Ces résultats prometteurs pourraient mener à une nouvelle technologie améliorée de cryoconservation pour des applications telles que la transplantation clinique des hépatocytes.

## 6.2 ABSTRACT

Cryopreserved hepatocytes with good hepatospecific functions upon thawing are important for clinical transplantation and for *in vitro* drug toxicity testing. However, cryopreservation reduces viability and certain hepatospecific functions, but the most pronounced change is diminished attachment efficiency of hepatocytes. Adhesion of cells to the extracellular matrix and cell-cell contacts are crucial for many aspects of cellular function. These processes are partly mediated and controlled by cellular adhesion molecules. The mechanisms responsible for reduced attachment efficiency of cryopreserved hepatocytes are not well understood. To address this question, we investigated the effect of a new cryopreservation procedure, using wheat proteins (WPs) or mixtures of recombinant forms of wheat freezing tolerance-associated proteins, on the stability of three important adhesion molecules ( $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin). Immunoblot analyses revealed that the levels of  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin were much lower in cryopreserved rat hepatocytes, when compared to fresh cells. Protein expression of the adhesion molecules was generally lower in cells cryopreserved with DMSO, compared to WPs. Moreover, the stability of the adhesion molecules was not affected by cryopreservation to the same degree, with more pronounced decreases occurring for  $\beta$ 1-integrin (62-74-%) >  $\beta$ -catenin (51-58%) > E-cadherin (21-37%). However, when hepatocytes were cryopreserved with partially purified WPs (SulWPE, AcWPE) or with mixtures of recombinant wheat proteins, there was a clear protective effect against the loss of protein expression of  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin. Protein expression was only 10 to 20% lower than that observed in fresh hepatocytes. These findings clearly demonstrate that WPs, and more particularly, partially purified WPs and recombinant wheat proteins, were more efficient for cryopreservation of rat hepatocytes by maintaining good expression of these adhesion molecules. These promising results could lead to a new and improved cryopreservation technology for applications such as clinical transplantation of hepatocytes.

### 6.3 INTRODUCTION

Cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) plays a central role in many complex biological processes, including cell shape, motility, growth, differentiation and survival (1,12). In particular, epithelial cells are attached to basement membranes by a variety of adhesive ECM glycoproteins, including collagen, laminin, fibronectin and proteoglycans. Cell-matrix attachment is crucial for three-dimensional cellular architecture, the establishment of basal–apical polarity and the maintenance of tissue integrity (3,20). Cell-cell contacts are also crucial to many aspects of cellular function, such as growth, differentiation, homeostasis and wound repair. These important processes are partly mediated and controlled by a number of cellular adhesion molecules that exhibit a well-regulated spatio-temporal pattern of expression during development and regeneration (24).

The most prominent family of ECM adhesion receptors is represented by the integrins. These are heterodimeric transmembrane proteins composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, with extracellular domains that bind to the ECM, and cytoplasmic domains associated with the actin cytoskeleton and other affiliated proteins, including vinculin, talin, paxillin and  $\alpha$ -actinin (18). Integrin-mediated attachment to the ECM plays an important role in regulating cell survival and proliferation. A decrease in levels of  $\beta 1$ -integrin is known to cause a loss of functional activities at focal adhesions (17).  $\beta 1$ -integrin-mediated attachment to the ECM is necessary for survival of hepatocytes (38).

Adhesion molecules that are involved in cell-cell contacts have been classified into several molecular families (20,44). The most important is the cadherin family ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adhesion molecules). This gene superfamily encodes transmembrane proteins that regulate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell–cell adhesion (58) and play a role in

maintaining the integrity of multicellular structures.  $\alpha$ -Catenin is linked to the cytoplasmic domain of cadherins via  $\beta$ - or  $\gamma$ -catenin but does not directly bind to cadherins (36). Due to high homology with vinculin, it was suggested that  $\alpha$ -catenin links the cadherin/catenin complex to the actin cytoskeleton (57). The loss of E-cadherin destabilizes the structural integrity of the epithelium and causes cells to dissociate from their neighbors (20). E-cadherin was originally named uvomorulin or liver cell adhesion molecule (L-CAM), thus suggesting that it is a major regulator of hepatocyte intercellular adhesion (16,42).

$\beta$ -Catenin is a multifunctional protein that is tightly regulated in cells. It plays a pivotal role in cell-cell adhesion, where it has a structural role at adherens junctions, linking E-cadherin to the actin cytoskeleton (59). E-cadherin and  $\beta$ -catenin were colocalised at contact regions in cultured hepatic cells (30). Cytoplasmic  $\beta$ -catenin is an important component of the Wnt signaling cascade, which regulates cell proliferation.  $\beta$ -catenin undergoes translocation to the nucleus where it forms heterodimeric complexes with the T cell factor/lymphoid enhancement factor family and is responsible for transactivating target genes (23,60). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway has been shown to be important in liver growth and development (2,33).  $\beta$ -Catenin was localized at the hepatocyte membrane in a normal adult rat liver with some cytoplasmic staining (33). Furthermore,  $\beta$ -Catenin undergoes regulation during matrigel-induced differentiation and maturation of rat hepatocytes, which results in increased stabilisation and translocation to the membrane.

Primary cultures of hepatocytes have been extensively used as a model system to investigate liver function, including drug metabolism, hepatotoxicity, protein biosynthesis and gene expression. Freshly isolated mature hepatocytes spread out rapidly and form monolayers when they are cultured in plastic dishes but they show reduced liver-specific functions (6). However, when they are cultured in plastic

dishes coated with liver-derived proteoglycan (26,55) or a synthetic substratum (54), they can aggregate into multicellular spheroids, retain their normal cell polarity and express certain differentiated functions for prolonged periods of time.

Hepatocytes isolated from human donor livers are being used currently for clinical transplantation in patients with acute liver failure (ALF) and liver-based metabolic defects (52). This approach is being developed as a less invasive alternative to orthotic liver transplantation. Successful cryopreservation of hepatocytes with good hepatospecific function upon thawing would allow the establishment of cell banks. This would ensure that large quantities of hepatocytes are readily available for emergency use in ALF patients and for repeated treatment in patients with chronic liver disease and metabolic disorders.

Although cryopreservation of human hepatocytes has been successfully used in clinical transplantation, further optimisation of cryopreservation protocols is necessary (52). Dimethyl sulfoxide (DMSO), a widely used cell-permeable cryoprotectant, is toxic to hepatocytes, particularly at temperatures such as 25°C and 37°C, and must be removed rapidly from contact with cells during post-thaw processing (52). Cryopreservation with DMSO causes decreases in viability and certain hepatospecific functions but the most pronounced change is the diminished attachment efficiency of hepatocytes upon thawing (28,29). Attachment efficiencies are even lower for cryopreserved human hepatocytes (53,61). This is a major problem during transplantation, where cells need to attach to the hepatic sinusoidal endothelium in the liver during the engraftment process (52). However, the mechanisms responsible for the decrease in attachment efficiency are not well understood. To address this question, we investigated the effect of a new cryopreservation procedure, using purified wheat proteins (WPs) and several wheat recombinant proteins, on the stability of three important adhesion molecules ( $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin) by Western blot analysis.

### 6.3 MATERIALS AND METHODS

#### Chemicals

Collagenase, insulin, Williams' medium E (WME), DMSO, propidium iodide (PI) and other chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Primary antibodies ( $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Leibovitz medium (L-15), gentamicin and MEM vitamins were from Gibco/Invitrogen Technologies (Burlington, ON). Fetal bovine serum (FBS) was from Medicorp (Montreal, QC).

#### Plant Materials and Growth Conditions

Winter wheat (*Triticum aestivum* L. cv Clair, LT<sub>50</sub> (lethal temperature that kills 50% of seedlings) -19°C) was used in this study. Wheat plants were grown as previously described (13,21). Briefly, plants were grown for 10 days under a 16 hour/day photoperiod with a light intensity of 250 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s at 20°C.

#### Protein Extraction

The aerial parts of the seedlings were homogenized in cold ultrapure water. The homogenate was filtered through three layers of miracloth and centrifuged at 30,000 g for 45 min at 4°C. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 with NaOH and sterilized using a 0.22  $\mu$ m filter. The extract was concentrated by freeze-drying and stored at -20°C. The dried powder was resuspended in ice-cold WME medium before being added to the hepatocyte suspension, as described previously (21).



### Purification of Wheat Proteins

The WPs extract was prepared as described previously (21). Subsequently, the WPs were partially fractionated by ammonium sulfate precipitation (0-20%, 21-40%, 41-60%, 61-80% and 81-100%) (SulWPE) or with acetone (55%) (AcWPE). After 1 h, the precipitate was dialyzed against ultrapure water overnight using 12–14,000 MWCO tubing (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) and freeze-dried.

### Production of Recombinant Wheat Proteins

The four wheat cDNA clones (WCS120, WCS19, *TaTIL* and *TaIRI-2*) (13,15,22,35,56) were expressed in the pTrcHis vector in *E. coli*. The bacteria were cultured in LB medium with ampicillin for 3 h and induced with 1mM isopropyl  $\beta$ -1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h. The proteins were purified on His-tag resin, as described previously (13).

### Hepatocyte Isolation

Hepatocytes were isolated from male Sprague–Dawley rats (140–180 g) (Charles River Canada, Saint-Constant, Que), using a two-step collagenase digestion technique (19,43). Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of experimental animals (37). Cell viability was evaluated with trypan blue by microscopy and with 2  $\mu$ M PI (40) by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON).

### Analysis of PI fluorescence by flow cytometry

Mean PI fluorescence intensity of 10,000 cells was calculated for each sample and corrected for autofluorescence obtained from samples of unlabeled cells. The analyser threshold was adjusted on the forward scatter (FSC) channel to exclude noise and subcellular debris (Fig 1A, box R1). Photomultiplier settings were adjusted to detect PI fluorescence on the FL3 detector and autofluorescence of hepatocytes on the FL-1 detector (Fig. 1B).

### Cryopreservation of Hepatocytes

Immediately after isolation, the hepatocyte suspension ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL for post-thaw viability tests or  $5 \times 10^6$  cells/mL for post-thaw adherence and immunodetection) was added to ice-cold WME medium supplemented with 10% FBS and different combinations of WPs or recombinant wheat proteins in cold cryovials. Positive (15% DMSO and 50% FBS) and negative (WME) controls were also prepared. Tubes containing cells were frozen at a cooling rate of  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  in a controlled freezing container (Nalgene, Rochester, NY) to  $-80^\circ\text{C}$  for 1 day, and then transferred to liquid nitrogen (21).

DMSO is used for hepatocyte cryopreservation at concentrations between 10% and 20.5% (9,10,41,47). We tested two different concentrations of DMSO, 10% and 15%, and found that 15% DMSO gave higher viability in rat hepatocytes (data not shown).

The conditions for cryopreservation of  $1.5 \times 10^6$  cells/mL were 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), or 20 mg of WPEs (WPEs), or 20 mg of SulWPE (SulWPE; 41-80% pooled fractions), or 20 mg of AcWPE (AcWPE), or with mixtures of recombinant proteins WCS19-TaTIL (5 mg/20 mg) or WCS120-TaIRI-2 (10 mg/30 mg). For cryopreservation of  $5 \times 10^6$  cells/mL, quantities of proteins were 60 mg for WPEs,

SulWPE, or AcWPE, and mixtures of recombinant proteins were WCS19-*Ta*TIL (15 mg/60 mg) or WCS120-*Ta*IRI-2 (30 mg/90 mg).

#### Thawing and Culture of Cryopreserved Hepatocytes

Frozen cells were thawed quickly by gentle agitation in a 37°C water bath and viability (70-80%) was determined by flow cytometry with 2 µM PI. Hepatocyte suspensions were diluted 10-fold with cold WME medium, immediately after thawing. After centrifugation (4°C, 50g, 2 min), hepatocytes were suspended in 10 mL of WME medium and washed twice. Dead cells were removed by a 30% isotonic Percoll centrifugation step (recovery of 85 %) and viability was determined (90-95 %). Post-thaw viability was very low in negative (WME) controls (1.6%).

Hepatocytes ( $2.5 \times 10^5$ /mL) were cultured in 12-well Corning plates in WME medium supplemented with insulin (0.2 mg/mL) and gentamicin (50 mg/mL) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. After 3 h, medium was changed and cells were incubated overnight in L-15 medium supplemented with insulin and gentamicin.

#### Cellular Morphology

Morphology of hepatocytes after 24 h in tissue culture plates was evaluated by microscopy (Carl Zeiss Ltd., Montreal, QC) and photographs were taken by digital camera (Camera CCD, Sony DXC-950P; Empix Imaging, Inc., Mississauga, ON). Images were analyzed using Northern Eclipse software.

### Viability

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in the medium of seeded, adherent hepatocytes (32). The hepatocyte culture medium was removed and activity of LDH released into the medium from adherent cells was quantified. The total amount of LDH activity was obtained by lysis of live cells with 10% Triton X-100 (31).

### Attachment Efficiency

Attachment efficiency was determined by measuring LDH activity in attached cells following 3 h or 24 h in culture, relative to that obtained in hepatocytes prior to seeding.

### Immunodetection of Adhesion Molecules

Cells were cultured for 24 h, then washed with PBS, scraped off plates and suspended in 100  $\mu$ L of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 6 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and homogenized by sonication. Proteins (40  $\mu$ g) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels (27) and then blotted onto polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked with 5% dry milk in TBS-T buffer (2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween) and incubated with primary antibodies (1/500). Protein bands were detected using western lightning chemiluminescence reagent plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) using a horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (1/1000). Protein level was analysed by densitometry using a Molecular Dynamics scanner (Amersham, Baie d'Urfe, QC) and IP Lab gel software (Scanalytics Inc., Fairfax, VA).

### Statistical Analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM for a minimum of three experimental repeats using cell preparations from three separate animals. For each cell preparation, three different protein batches were used for cryopreservation and each condition was analysed with at least three replicate dishes. Data were normalized to non-cryopreserved experimental controls at each time interval in the same experiment. Comparison between groups and analysis for differences between means of control and treated groups were performed using ANOVA followed by the post hoc test Newman–Keuls ( $P < 0.05$ ). The threshold for statistical significance was:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 6.5 RESULTS AND DISCUSSION

### Optimisation of Cryopreservation Protocol

We reported recently an improved cryopreservation technology for rat hepatocytes using WPs (21). In the present study, we optimized the cryopreservation procedure using WPs that were partially purified using ammonium sulfate precipitation (SulWPE) or acetone (AcWPE), as well as with recombinant forms of different wheat freezing tolerance-associated proteins. Optimal viability and cryopreservation potential were obtained when hepatocytes were cryopreserved with WPs from the 41 to 80% fractions. We subsequently evaluated the effects of purified WPs and recombinant wheat proteins on morphology, viability, attachment efficiencies and the stability of several important cellular adhesion molecules in rat hepatocytes.

### Cellular Morphology

Morphological analysis shows that fresh hepatocytes were more spread out and formed monolayers on culture substrates, when compared to cryopreserved cells (Fig. 2). Hepatocytes that were cryopreserved with WPs, purified WPs (SulWPE, AcWPE) or with mixtures of recombinant proteins, had similar morphologies (Fig. 2). They were more spread out and had cell-cell contacts, compared to those cryopreserved with DMSO. However, they still had a more rounded phenotype compared to fresh cells.

### Viability and Attachment Efficiencies

Viabilities of hepatocytes following cryopreservation with partially purified WPs (SulWPE, AcWPE) and the recombinant proteins WCS120-TaIRI-2 ranged from 77.32 to 91.27% and were higher than those obtained with WPs (72.15%) or DMSO (66.93%) (Table 1). The highest viability value (91.27%) was obtained with the mixture of WCS120-TaIRI-2 recombinant proteins. This value was comparable to that of fresh cells (92.67%). The attachment efficiencies after 24 h in culture for hepatocytes cryopreserved with SulWPE, AcWPE or mixtures of recombinant proteins ranged from 70.3 to 74.3%, and were also higher compared to values obtained with DMSO (50.3%) or WPs (50.9%) (Table 1). The corresponding numbers of viable cells after 24 h of monolayer culture are also given in Table 1. Attachment efficiencies for DMSO-cryopreserved hepatocytes from various animal species are generally in the range of 50%, compared to fresh cells (9-11,46,48-50). For human hepatocytes, recent advances allow about 50% of batches of hepatocytes isolated from different human livers to be plated as monolayer cultures («plateable» hepatocytes) after cryopreservation (28). However, attachment efficiencies of «plateable» cryopreserved human cells ranged from 5 to 40% on collagen-coated plates (51,52,61). Cellular adhesion is very important because cell density and cell-cell contacts have an impact on metabolic activities and functional integrity of hepatocytes. Although many investigators have attempted to restore these properties of mature hepatocytes in monolayer cultures of cryopreserved cells, most attempts have failed or gave unsatisfactory results. This could be due to the loss of polarized configuration of hepatocytes (4). The matrix architecture of cultured hepatocytes plays a crucial role in maintaining and restoring hepatic gene expression (4,14,34,39).

### Immunodetection of Adhesion Molecules

Western blot analysis was used to compare the expression of three important adhesion molecules,  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin, between cryopreserved and fresh hepatocytes (Fig. 3). Protein levels for  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin were much lower in cryopreserved cells, relative to fresh hepatocytes (Fig. 3A). Protein expression of these three adhesion molecules was similar in cells cryopreserved with WPs or DMSO (Fig. 3A). However, the effect of cryopreservation on the levels of adhesion molecules was different, with more pronounced decreases occurring for  $\beta$ 1-integrin (62-74%) >  $\beta$ -catenin (51-58%) > E-cadherin (21-37%) (Figs. 3B-3D). Hepatocytes that were cryopreserved with WPs, compared to DMSO, maintained higher protein levels of  $\beta$ 1-integrin and E-cadherin (Figs. 3C, 3D). However, the loss of protein was more than 50%. This loss of protein expression of the three adhesion molecules was markedly reversed in hepatocytes that were cryopreserved with SulWPE, AcWPE or mixtures of recombinant proteins (Fig. 3A). Proteins levels of adhesion molecules were similar and only 15 to 20% lower than those in fresh hepatocytes, for all four of the wheat protein samples (Figs. 3B-3D). For  $\beta$ 1-integrin,  $\beta$ -catenin and E-cadherin, protein expression was about 60%, 40% and 20% higher, respectively, for cells cryopreserved with partially purified or recombinant wheat proteins, when compared to DMSO (Figs. 3B-3D). These findings clearly show that cryopreservation leads to down-regulation of three important cellular adhesion molecules in rat hepatocytes. A decrease in levels of E-cadherin and  $\beta$ -catenin could explain the loss of cell-cell contacts, while the loss of  $\beta$ 1-integrin is likely to be involved in the lack of adhesion to the culture substrate. These results demonstrate that partially purified WPs and recombinant wheat proteins were significantly more efficient than DMSO for cryopreservation of rat hepatocytes.



There is very little information about the effect of cryopreservation on attachment molecules in hepatocytes. It was reported recently that twenty-two genes including integrins, cadherins and catenins were down-regulated after cryopreservation of human hepatocytes with DMSO (52). Gene and protein expression of E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin were significantly down-regulated in cryopreserved cells. There was a link between the decrease in  $\beta$ 1-integrin and the loss of attachment. The cytoplasmic domain of E-cadherin underwent cleavage, suggesting that cryopreservation could increase degradation of adhesion molecules. Our findings confirm the downregulation of  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in rat hepatocytes. An important finding is that cryopreservation with partially purified WPs and recombinant wheat proteins showed promising potential by significantly reversing these effects.

The higher cryopreservation capacity of WPs, SulWPE and AcWPE, compared to DMSO, is probably explained by protective effects of WPs against degradation of the adhesion molecules by unknown processes. The wheat proteins may protect the plasma membrane against cryopreservation-induced damage. It is also possible that WPs enhance the association and stability of adhesion molecules at the hepatocyte membrane. WPs could protect the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor and thus conserve the E-cadherin-mediated cell-cell contacts. WPs could also protect Src-family tyrosine kinases that are clearly an essential part of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced E-cadherin signaling pathway. The tyrosine phosphorylation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin increased the association of  $\alpha$ -catenin with E-cadherin in differentiating keratinocytes (7). This strengthening of cell adhesion was due to the bridging ability of  $\alpha$ -catenin between the cadherin/catenin complex and the actin cytoskeleton. The inhibition of Src-family tyrosine kinases suppressed the formation of adherens junctions, disrupted catenin/cadherin complexes and decreased cell adhesion (7).

The higher capacity of recombinant proteins to protect the adhesion molecules could be related to their native functions in wheat. WCS120 is a dehydrin that could

possibly coat essential cellular proteins and protect them against conformational changes or agglomeration during freezing or dehydration (22). WCS120 was shown to protect LDH against freezing-induced denaturation by 100-fold compared to BSA (22). Thus, WCS120 could protect the integrity of adhesion molecules and prevent their detachment from the plasma membrane. Less is known about the function of WCS19, which appears to play a role in the enhancement of freezing tolerance (35).

*TaTIL* is a plant lipocalin associated with the plasma membrane in freezing tolerant plants. Functional studies revealed that this protein is involved in protecting plant cells against oxidative stress caused by freezing. *TaTIL* transcripts and proteins are upregulated during stresses such as cold and heat shock, which are known to induce membrane damage (8,15). Thus, *TaTIL* is likely to protect the plasma membrane from cryopreservation-induced membrane damage and prevent the loss of adhesion molecules.

*TaIRI-1* and *TaIRI-2* (*Triticum aestivum* ice recrystallization inhibition) are low temperature responsive genes in wheat that are up-regulated during cold acclimation in freezing-tolerant species (56). *TaIRI-1* and *TaIRI-2* are extracellular proteins that accumulate in the apoplast of freezing tolerant plants, such as wheat, when they cold acclimate. The primary structure of *TaIRI* proteins shows a series of highly conserved repeated motifs with regularly spaced serine and threonine residues that may form hydrogen bonds with the ice surface and this inhibit the growth of ice crystals in the extracellular space (45). This enables plants to avoid damage to the membrane and survive the dehydration caused by the formation of large ice crystals outside of cells. Based on these properties, it is likely that *TaIRI-1* and *TaIRI-2* exert their effects as ice recrystallization inhibition proteins outside of the hepatocytes, by avoiding the formation of large ice crystals in the extracellular medium, and thus protecting the integrity of the cell membrane from any mechanical damage. Furthermore, the extracellular ice is essential for the initiation of ice formation inside cells.

Intracellular ice formation is known to inflict damage during cryopreservation of cultured hepatocytes and many other cell types (25). Therefore, the ability of the *TaIRI* protein to inhibit the growth of ice crystals at the extracellular level would also decrease intracellular ice formation, which is likely to contribute to improved survival and protection of the plasma membrane during the cryopreservation of hepatocytes. All of these wheat proteins appear to be expressed in response to membrane stresses (5), which suggests that they play a biological role in membrane biogenesis and repair under conditions of severe stress.

LDH leakage was previously investigated during a longer in vitro period of 4 days following cryopreservation of hepatocytes with crude wheat extracts (WPEs) (21). The crude WPEs maintained viability of cells at a similar level to that obtained in freshly isolated hepatocytes during 4 days of monolayer culture following cryopreservation. After 4 days, respective viabilities of 33.1%, 35.8% and 17.6% were obtained in fresh, WPE-cryopreserved and DMSO-cryopreserved hepatocytes. Furthermore, hepatocytes cryopreserved with crude WPEs maintained similar levels of hepatic functions, compared to fresh cells, for secretion of albumin, ammonia metabolism and induction of CYP1A1 and CYP2B during 4 days in culture following cryopreservation (21). Crude WPEs, compared to DMSO, caused a marked improvement in viability and hepatospecific functions throughout a 4 day in vitro culture period, following cryopreservation of hepatocytes.

The findings in this study demonstrate the capacity of partially purified WPs and recombinant wheat proteins to improve the attachment efficiency of rat hepatocytes by protecting three key adhesion molecules ( $\beta$ 1-integrin,  $\beta$ -catenin and E-cadherin), which are known to be important for the structural and metabolic integrity of hepatocytes in cell culture. The determination of the mechanisms by which WPs protect these molecules could help to further optimize the procedure and obtain cryopreserved hepatocytes with similar attachment efficiencies to fresh cells. This

promising technology offers a novel strategy for hepatocyte cryopreservation that could be useful for improving clinical hepatocyte transplantation, which is currently limited by the timely availability of hepatocytes. Future work will validate this technology in human hepatocytes.

#### Acknowledgement

The authors wish to thank Michel Marion for assistance with animal surgeries to obtain hepatocytes.

Table 1: Viability and Attachment Efficiency of Rat Hepatocytes following Cryopreservation with WPs, Purified WPs and Recombinant Wheat Proteins

<sup>1</sup> Cryopreservation protocol	<sup>2</sup> Viability	<sup>3,4</sup> Attachment efficiency (%) - 3 h	<sup>3,4</sup> Attachment efficiency (%) - 24 h	<sup>5</sup> Number of viable cells in culture – 24 h
Fresh hepatocytes	92.67 ± 2.89	100 ± 0.5	100.0 ± 2.4	1.93 x10 <sup>5</sup>
DMSO (15%)	66.93 ± 2.25	64.9 ± 1.7	50.3 ± 4.1	0.97 x10 <sup>5</sup>
WPEs	72.15 ± 1.35	63.7 ± 1.5	50.9 ± 2.9	0.98 x10 <sup>5</sup>
SulWPE (40-80%)	83.64 ± 1.28	76.4 ± 1.4	72.3 ± 2.5	1.40 x10 <sup>5</sup>
AcWPE	77.32 ± 2.87	76.5 ± 1.3	70.3 ± 2.4	1.36 x10 <sup>5</sup>
WCS19-TaTIL	66.52 ± 2.73	77.4 ± 1.8	74.3 ± 2.8	1.43 x10 <sup>5</sup>
WCS120-TaIRI-2	91.27 ± 0.26	77.2 ± 1.7	73.3 ± 2.6	1.41 x10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Cryopreservants used were 15% DMSO + 50 % FBS (DMSO), WPEs (20mg), SulWPE (20 mg), AcWPE (20 mg), WCS19-TaTIL (5 mg/20 mg) or WCS120-TaIRI-2 (10 mg/30 mg).

<sup>2</sup> Viability was determined using PI. Similar values were obtained using trypan blue.

<sup>3</sup> Attachment efficiency was evaluated by LDH activity in freshly isolated hepatocytes and in attached cryopreserved hepatocytes after 3 h and 24 h in culture.

<sup>4</sup> Values for attachment efficiency were normalized to fresh cells. The absolute value for attachment efficiency of fresh cells after 3 h and 24 h was 77.3 ± 0.5%.

<sup>5</sup> 2.5 x 10<sup>5</sup> cells were plated and number of viable cells is given after 24 h in culture.

Data is expressed as mean ± SEM. from three different experiments.

## 6.6 FIGURE LEGENDS

Figure 1: Dot plot for analysis of PI fluorescence by flow cytometry

Following cryopreservation, hepatocytes were analysed for PI fluorescence by flow cytometry. (A) Hepatocytes are shown within the R1 gate, which excludes noise and subcellular debris. (B) Autofluorescence of hepatocytes is detected using the FL-1 channel, while PI fluorescence is detected with the FL-3 channel in order to distinguish viable and non-viable (PI uptake) cells.

Figure 2: Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on cellular morphology of cryopreserved hepatocytes

Cellular morphology was visualized after 24 h of culture of thawed rat hepatocytes, following cryopreservation for 7 days in WME 10% FBS supplemented with either 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), or WPEs, or SulWPE, or AcWPE, or with mixtures of recombinant proteins, WCS19-*Ta*TIL or WCS120-*Ta*IRI-2. Freshly isolated hepatocytes served as reference control. Hepatocytes ( $250 \times 10^3$ ) were visualized by microscopy (magnification: 10X). Photographs are from one representative experiment, which was repeated at least three times.

Figure 3: Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on protein expression of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes

(A) Protein expression of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin was determined by immunoblotting after 24 h of culture of rat hepatocytes, following cryopreservation for 7 days in WME supplemented with either 15% DMSO and 50% FBS (DMSO), or WPEs, or SulWPE, or AcWPE, or with mixtures of WCS19-*Ta*TIL or WCS120-*Ta*IRI-2. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Protein expression of (B)  $\beta$ -catenin, (C)  $\beta$ 1-integrin and E-cadherin (D) was analysed by densitometry, using GAPDH as loading control. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements from four independent experiments (n=12). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

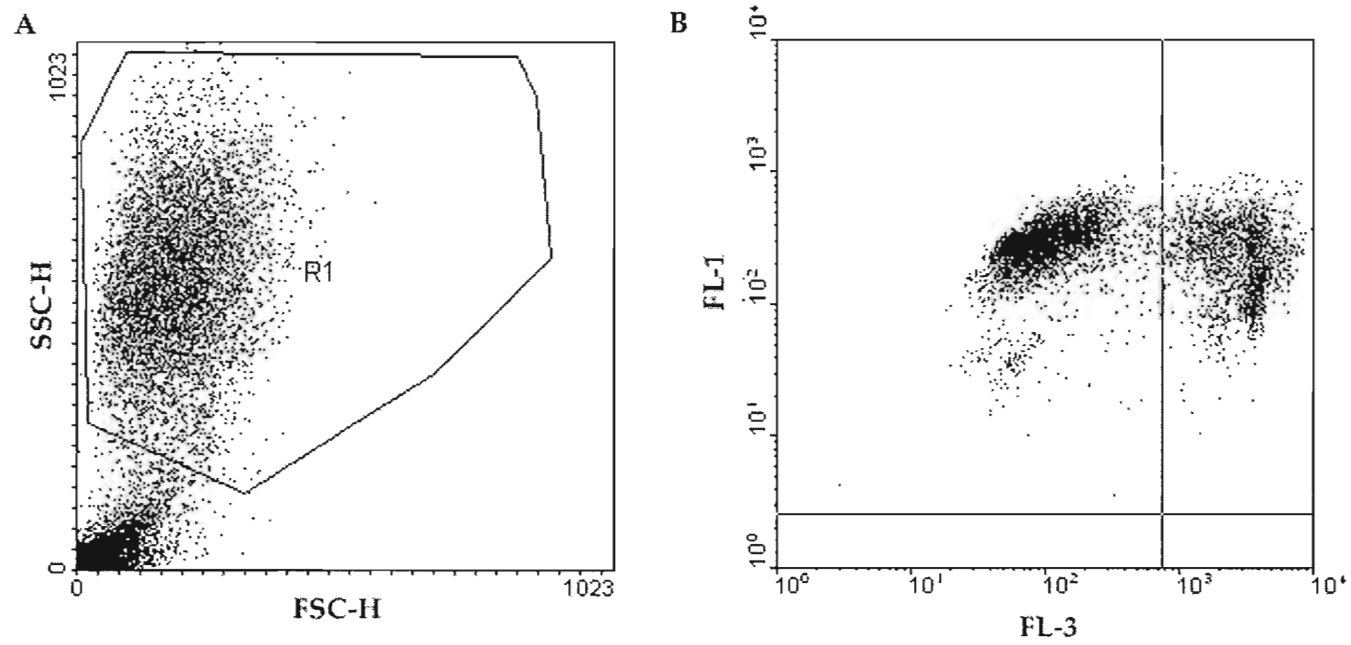


Figure 1 Dot plot for analysis of PI fluorescence by flow cytometry



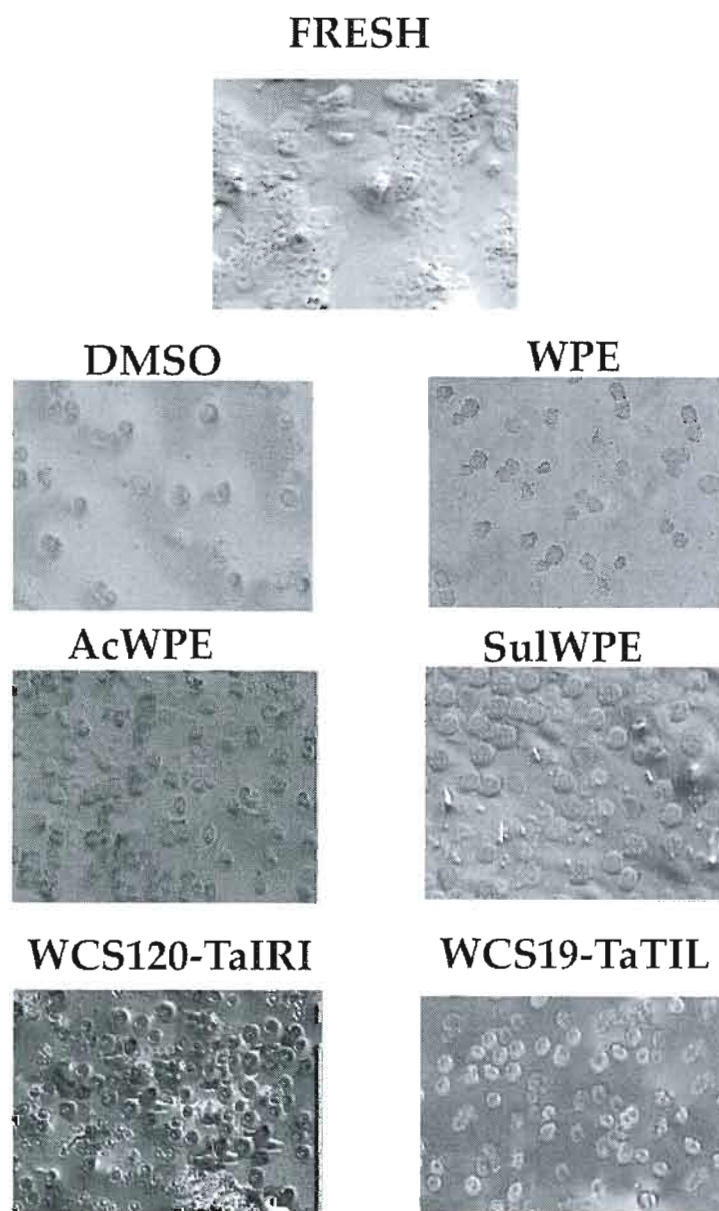
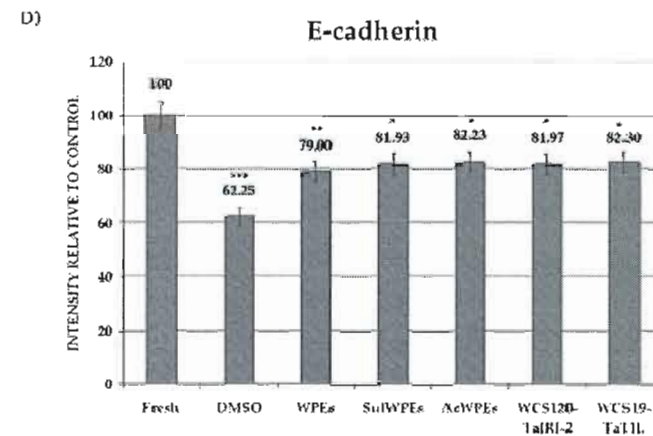
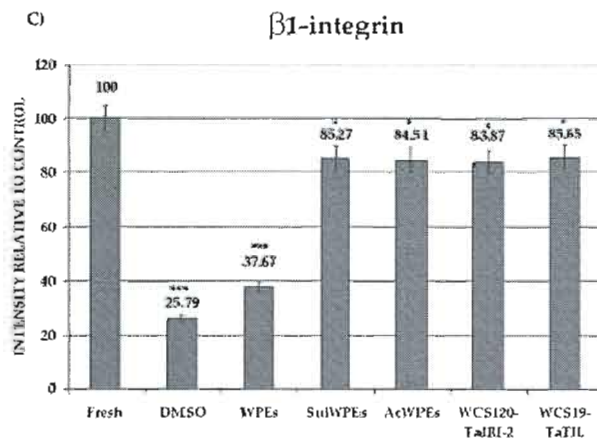
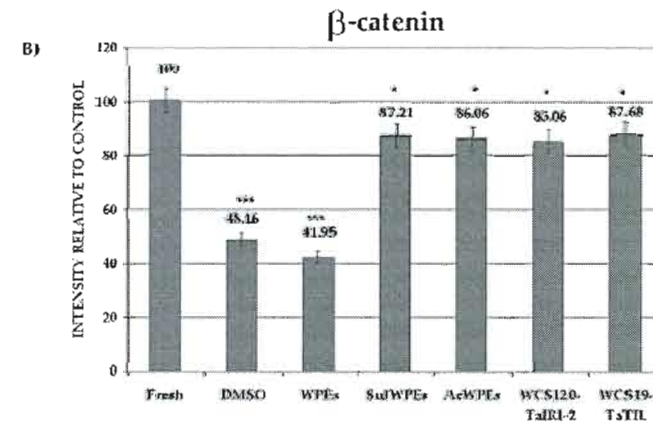
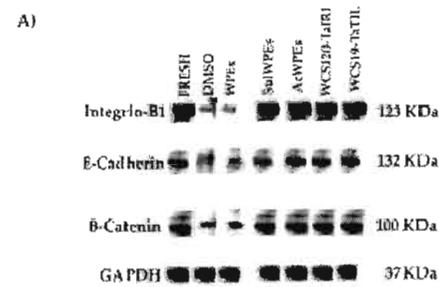


Figure 2 Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on cellular morphology of cryopreserved hepatocytes



**Figure 3** Effects of WPEs, partially purified WPs and recombinant proteins on protein expression of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes

## **CHAPITRE VII**

### **WHEAT PROTEINS IMPROVE CRYOPRESERVATION OF RAT HEPATOCYTES**

## Wheat Proteins improve Cryopreservation of Rat Hepatocytes

Mélanie Grondin, Francine Hamel, Diana A. Averill-Bates and Fathey Sarhan

Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P.8888,  
Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

Corresponding author: Dr Fathey Sarhan  
Université du Québec à Montréal  
Département des Sciences biologiques  
C.P. 8888, Succursale Centre-ville  
Montréal, Québec H3C 3P8  
Canada  
Telephone : (514) 987-3000, ext. 3363  
Fax : (514) 987-4647  
E-mail : sarhan.fathey@uqam.ca

\* par souci pour l'environnement les références ne seront citées qu'à la fin de la thèse

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilités spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Mélanie Grondin : rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, mise au point des protocoles, conceptualisation des manipulations en regard de notre problématique, préparation des extraits.

Francine Hamel : participation à la mise au point des protocoles et conceptualisation des manipulations.

Diana Averill-Bates : rédaction

Fathey Sarhan : rédaction, encadrement et participation à la planification de l'expérimentation

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE:  
L'auteur principal de l'article intitulé: Purified Wheat Proteins Extracts and Recombinants Proteins as an Efficient Cryoprotective Agent for Primary Cultures of Rat Hepatocytes

Soumis pour publication ☒, accepté pour publication ☐, ou publié dans : Biotechnology and Bioengineering (manuscript 08-545)

Auteur principal est:

Mélanie Grondin

  
Signature

18-7-08  
Date

Directeur de recherche :

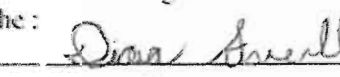
Fathey Sarhan

  
Signature

18-07-08  
Date

Co-Directeur de recherche :

Diana Averill-Bates

  
Signature

18-07-08  
Date

## 7.1 RÉSUMÉ

Les hépatocytes sont un modèle physiologique important pour les études *in vitro* sur le métabolisme des médicaments. Cependant, les hépatocytes frais ne sont pas toujours disponibles pour ce type d'étude et la cryoconservation est nécessaire pour préserver ainsi une grande quantité de cellules jusqu'à ce qu'elles soient nécessaires. Les hépatocytes sont extrêmement sensibles aux dommages cellulaires induits par la congélation et le dégel, même après l'addition des cryoprotectants traditionnels tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO). En outre, ils ne prolifèrent pas en culture. Nous avons considérablement amélioré notre procédé original de cryoconservation en employant des extraits de blé partiellement purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium ou à l'acétone, ou en employant les protéines recombinantes associées à la tolérance au gel chez le blé telles que WCS120, TaTIL, WCS19 et TaIRI-2. Ces améliorations permettent la récupération d'une grande quantité de cellules saines après la cryoconservation et un entreposage à long terme (2-12 mois). Les cellules maintiennent leurs fonctions hépatospécifiques, comparativement aux cellules fraîchement isolées, comme le démontre la viabilité (77-93%), l'adhérence (77%) et maintien des fonctions métaboliques des isoformes du cytochrome P450, 1A1/2, 2C6, 2D2 et 3A1/2. Les avantages d'utiliser des protéines de blé comme cryoprotectants sont qu'elles sont des produits non-toxiques et naturels qui ne demandent pas l'ajout de sérum animal, et de plus elles sont économiques et faciles pour préparer.

## 7.2 ABSTRACT

Hepatocytes are an important physiological model for *in vitro* studies of drug metabolism and toxicity. However, fresh hepatocytes are not always available and hence cryopreservation is needed to preserve large quantities until they are needed for these applications. Hepatocytes are extremely sensitive to damage induced by the freeze-thaw process, even after addition of traditional cryoprotectants such as dimethyl sulfoxide (DMSO). Furthermore, they do not proliferate in culture. We previously demonstrated that a crude wheat extract protects rat hepatocytes during cryopreservation and could provide a promising alternative to DMSO. We have considerably improved this novel cryopreservation procedure by using wheat extracts that are partially purified by either ammonium sulphate or acetone precipitation, or by using recombinant wheat freezing tolerance-associated proteins such as WCS120, TaTIL, WCS19 and TaIRI-2. These improved procedures enhance long-term storage (2-12 months) and recovery of large quantities of healthy cells after cryopreservation, and maintain the differentiated functions of rat hepatocytes, compared to freshly isolated cells, as judged by viability (77-93%), adherence (77%) and metabolic functions of major cytochrome P450 isoforms 1A1/2, 2C6, 2D2 and 3A1/2. The advantage of using wheat proteins as cryopreservants is that they are non-toxic, natural products that do not require animal serum, and are economical and easy to prepare.

### 7.3 INTRODUCTION

Hepatocytes are extremely sensitive to damage incurred during freezing and thawing, even after addition of classical cryoprotectants. Improved cryopreservation techniques are thus needed to reduce cell injury and functional impairment of hepatocytes. Cryoprotective agents such as dimethyl sulfoxide (DMSO) are currently used to protect cells and tissues from dehydration caused by the formation of intracellular ice during freezing. However, they are either toxic and need to be eliminated rapidly after freezing (Fahy, 1986) or cause an osmotic stress that affects the metabolic competence of cells (Mazur, 1984; Schneider et Mazur, 1987). Consequently, cryopreserved cells do not display the metabolic state of fresh cells or tissues, and their use can lead to erroneous interpretation of results. It is therefore essential to develop alternatives to replace DMSO as a cryopreservation agent. Furthermore, to better protect cell function, DMSO is used in combination with animal serum, which also needs to be eliminated from cryopreservation protocols for clinical applications, due to risks of spreading zoonotic diseases.

Studies reporting on several hepatocyte cryopreservation protocols showed that functional activity can be maintained for the majority of enzymes involved in hepatocyte metabolism (Li *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 1999). However, the inherent problem associated with the rapid loss of CYP metabolic activity when hepatocytes are maintained as monolayer cultures remains problematic. To circumvent this problem, sugars and inhibitors of caspases have been used to increase hepatocyte stability (Baust *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2005; Stroh *et al.*, 2002). Our previous work showed that the use of a crude wheat protein extract (WPE) as cryoprotector improved the hepatospecific functions, compared to DMSO, and allowed hepatocytes to be maintained in culture for 4 days (Hamel *et al.*, 2006). This cryoprotective effect



is probably due to the presence of a mixture of sugars, osmoprotectors, antioxidants and proteins in the plant extract.

The goal of the present study is to improve the cryoprotective potential of the promising WPE in primary cultures of rat hepatocytes. To isolate the active fractions, the WPE was purified using different protein precipitation procedures and tested for cryopreservation activity. In addition, we tested the cryoprotective potential of different recombinant wheat proteins known to be involved in freezing tolerance, such as WCS120 (Wheat Cold Specific protein 120), WCS19 (Wheat Cold Specific protein 19), WCOR410 (Wheat COLD Regulated protein 410), *TaTIL* (*Triticum aestivum* Temperature Induced Lipocalin) and *TaIRI-2* (*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibition protein). We evaluated whether the purified and recombinant wheat proteins could enhance the long-term storage and recovery of large quantities of healthy cells, and maintain the differentiated functions of hepatocytes as judged by viability, adherence and metabolic functions of major cytochrome P450 (CYP 450) isoforms.

## 7.4 MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Collagenase, insulin, Williams' medium E (WME), dimethyl sulfoxide (DMSO), dexamethasone, phenobarbital, dextromethorphan and other chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Leibovitz medium (L-15), gentamicin and MEM vitamins were from Gibco/Life Technologies (Burlington, Ont). Fetal bovine serum (FBS) was from Medicorp (Montreal, QC). 3-Cyano-7-ethoxycoumarin (CEC), 7-methoxy-4-(trifluoro-methyl)coumarin (MFC) and 3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium) ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) were purchased from BD Gentest (Mississauga, ON) and 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]furan-2(5H)-one (DFB) was generously offered by Merck Frosst (Montreal, QC) (Nicoll-Griffith *et al.*, 2004).

### Plant Materials and Growth Conditions

Winter wheat genotype (*Triticum aestivum* L. cv Clair, LT<sub>50</sub> (lethal temperature that kills 50% of seedlings) -19<sup>0</sup>C) was used in this study. Wheat plants were grown for 10 days at 20<sup>0</sup>C under a 16 hour/day photoperiod with a light intensity of 250 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s and treated as previously described (Danyluk *et al.*, 1998).

### Protein Extraction

The aerial parts of seedlings were collected and blended until a homogeneous solution was obtained with cold nanopure water. The homogenate was filtered through 3 layers of miracloth and centrifuged at 30 000 g for 45 min at 4<sup>0</sup>C. The pH of the supernatant was adjusted to 7.4 and sterilized using a 0.22  $\mu$ m filter. The

extract was concentrated by freeze-drying and stored at -20°C. The dried powder was resuspended in ice-cold WME medium before being added to the hepatocyte suspension, as described previously (Hamel *et al.*, 2006).

### **Purification of Wheat Proteins**

The wheat protein extract was partially purified by precipitation with ammonium sulphate (0-20 %, 21-40 %, 41-60 %, 61-80 % and 81-100 %) (SulWPE) or acetone (55 %) (AcWPE). After 1 h, the precipitate was dialyzed against ultrapure water overnight using 12–14,000 MWCO tubing (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) and freeze-dried.

### **Production of Recombinant Wheat Proteins**

The five wheat cDNA clones (WCS120, WCS19, WCOR410, *TaTIL* and *TaIRI-2*) (Danyluk *et al.*, 1998; Frenette Charron *et al.*, 2002; Houde *et al.*, 1995; N. Dong *et al.*, 2002; Tremblay *et al.*, 2005) were expressed from the pTrcHis vector in *E. coli*. The bacteria were cultured in LB medium supplemented with ampicillin and induced with 1 mM isopropyl  $\beta$ -1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h. The proteins were purified on His-tag resin, as described previously (Danyluk *et al.*, 1998).

### **Hepatocyte Isolation**

Hepatocytes were isolated from male Sprague–Dawley rats (140–180 g) (Charles River Canada, Saint-Constant, QC), in a two-step collagenase digestion technique (Guillemette *et al.*, 1993; Seglen, 1976). Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for the care and use of experimental animals (Olfert *et al.*, 1993). Cell viability, evaluated by

FACScan (excitation at 488 nm) (Becton Dickinson, San Jose, CA) with 2  $\mu$ M propidium iodide (PI) (Reader *et al.*, 1993), generally exceeded 75%.

### **Cryopreservation of Hepatocytes**

Immediately after isolation, the hepatocyte suspension ( $1.5 \times 10^6$  cells) was added to ice-cold WME medium supplemented with 10 % FBS and either 20 mg of crude protein extract (WPE), 20 mg of partially purified proteins (SulWPE or AcWPE), or different combinations of recombinant wheat proteins (WCS120, WCS19, WCOR410, TaTIL and TaIRI-2) in cold cryovials. Positive (15 % DMSO and 50 % FBS) and negative (WME) controls were also prepared. Tubes containing cells were frozen at a cooling rate of 1°C/min in a controlled freezing container (Nalgene, Rochester, NY) to -80°C for 1 day, and then transferred to liquid nitrogen (Hamel *et al.*, 2006).

### **Thawing and Culture of Hepatocytes**

Frozen cells were thawed quickly by gentle agitation in a 37°C water-bath and viability (70-80%) was determined using 2  $\mu$ M PI by FACScan. After centrifugation (4°C, 50g, 2 min), hepatocytes were suspended in 10 mL of WME medium and washed twice. When viability was lower than 80%, dead cells were removed by a 30% isotonic Percoll centrifugation step and viability was determined (90-95%). Recovery of cells after this step was 85%. Post-thaw viability was very low in negative (WME) controls (1.6%).

Hepatocytes were diluted to  $3.5 \times 10^5$ /mL and cultured in tissue culture plates (Corning, Acton, MA) in WME medium supplemented with 10% FBS, insulin (0.2  $\mu$ g/mL) and gentamicin (50  $\mu$ g/mL) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. After 3 h, medium was changed and cells were incubated overnight in L-15 medium (Reader *et al.*, 1993) supplemented with insulin and gentamicin.

## **Viability Assays**

### **Live-Dead Assay**

After the freeze/thaw cycle, cell suspensions were stained immediately with the fluorescent probes 4 mM calcein and 2  $\mu$ M PI in WME medium for 5 min and analyzed by FACScan. The numbers of live cells expressing green fluorescence of calcein and dead cells expressing red fluorescence of PI were determined with Cell Quest software (Becton Dickinson).

### **Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay**

LDH activity was determined in the medium of seeded adherent hepatocytes (Moldeus *et al.*, 1978). The hepatocyte culture medium was removed and activity of LDH released into the medium from adherent cells was quantified. The total amount of LDH activity was obtained by lysis of live cells with 10 % Triton X-100 (Moffatt *et al.*, 1996).

### **Plating Efficiency**

Plating efficiency was determined by measuring LDH activity in cells prior to seeding and after 3 and 24 h in culture. Plating efficiency was defined as LDH activity after 24 h of culture divided by LDH activity in pre-culture cells.

### **Adherence and Cellular Morphology**

Morphology of hepatocytes after 24 h in tissue culture plates was evaluated by microscopy (Carl Zeiss Ltd., Montreal, QC, Canada) and photographs were taken by

digital camera (Camera CCD, Sony DXC-950P; Empix Imaging, Inc., Mississauga, Ont). Images were analyzed using Northern Eclipse software.

### **Activity of Cytochrome P450 Isoforms**

The basal enzymatic activities were measured in hepatocyte suspensions immediately post-thaw using fluorescent substrates for CYP450 isoforms 1A1/2 (CEC; ex: 410nm, em: 450nm), 2D2 (AMMC; ex: 410nm, em: 450nm), 2C6 (MFC; ex: 410nm, em: 500nm) and 3A1/2 (DFB; ex: 340nm, em: 450nm). Cells were incubated with 25  $\mu$ M of different substrates for 0, 5, 10, 15, 20 and 30 min. After the incubation, 150  $\mu$ L of cell suspension was added to 150  $\mu$ L of acetonitrile, or 60 % acetonitrile in 40 % Tris base (pH 10, DFB). Fluorescence was detected using a spectrofluorimeter (SPECTRAFluor Plus, Tecan, CA).

For induction of CYP activities, hepatocytes were cultured for 24 h and then treated for 48 h with benzo-a-pyrene (10  $\mu$ M, CYP 1A1), dextromethorphan (50  $\mu$ M, CYP 2D2), phenobarbital (50  $\mu$ M, CYP 2C6), or dexamethasone (50  $\mu$ M, CYP 3A1/2). Cells were washed twice with PBS and incubated for 0, 15 and 30 min with CEC, AMMC and MFC, and for 0, 5, 15 20 and 30 min with DFB. For CEC, AMMC and MFC, 200  $\mu$ L of acetonitrile was added to stop the reaction. Cells were scraped and 200  $\mu$ L was transferred into a 96-well microplate. For DFB, 100  $\mu$ L of supernatant was added to 100  $\mu$ L of 60 % acetonitrile in 40 % Tris base (pH 10) in a 96-well microplate.

### **Statistical Analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three replicate dishes for each condition with a minimum of three experimental repeats using cell preparations from different animals. Comparison between groups and analysis for differences between

means of control and treated groups were performed using ANOVA followed by the post hoc test Newman–Keuls ( $P < 0.05$ ). The threshold for statistical significance was:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), and  $P < 0.001$  (\*\*\*)).

## 7.5 RESULTS AND DISCUSSION

### **Cryopreservation Potential of Purified WPEs in Rat Hepatocytes**

The ability of purified WPEs to improve the viability of cryopreserved rat hepatocytes was compared to the classical standard, DMSO. Figure 1 presents the viability of suspensions of hepatocytes after 7 days of freezing in the presence of WPEs, or WPEs purified by ammonium sulphate (SulWPE) or acetone precipitation (AcWPE), or DMSO, compared to fresh hepatocytes. The viability of hepatocytes that were cryopreserved with 15 % DMSO + 50 % FBS (positive control) was 66.9 %, compared to 92.7 % for freshly isolated hepatocytes. When hepatocytes were cryopreserved with 20 mg of WPEs, a viability of 72.2 % was obtained. However, considerable improvement was obtained with purified WPEs, where 20 or 40 mg of AcWPE gave viabilities of 77.3 and 84.9 %, respectively. These values are higher than those obtained with the crude extract of WPEs or the classical cryoprotectant DMSO. The use of WPEs purified with different degrees of ammonium sulphate saturation (40, 60 and 80 %) indicated that proteins precipitated in the 40 to 60% and 61-80 % windows gave the highest cryopreservation activities (82.6 and 84.3 %, respectively). Very low viability was obtained with WME medium alone (0.9 %) (negative control).

### **Cryopreservation Potential of Recombinant Proteins in Rat Hepatocytes**

Subsequently, the ability of individual wheat recombinant proteins WCS120, WCS19, WCOR410, *Ta*TIL and *Ta*IRI-2 to improve viability of cryopreserved rat hepatocytes was determined. Figure 2 presents the viability of hepatocyte suspensions after 7 days



of freezing in the presence of different concentrations (1 to 30 mg) of the 5 proteins. The different proteins had variable effects on the viability of cryopreserved hepatocytes, indicating that their effects were dependent on the nature of the protein. The optimal viabilities obtained were 23.5 % for 10 mg of WCS120, 37.1 % for 5 mg of WCS19, 19.4 % for 20 mg of WCOR410, 37.7 % for 20 mg of *TaTIL* and 45.9 % for 30 mg of *TaIRI-2*. These values were lower than those obtained when hepatocytes were cryopreserved with WPEs (72.1%) or DMSO (66.9%). We subsequently determined whether mixtures of two recombinant proteins could improve cryopreservation potential in rat hepatocytes (Fig. 3). The mixtures were prepared with the optimal concentrations of each protein, obtained in Figure 2. The highest viabilities obtained were 66.9 and 91.3 % for the combinations of WCS19-*TaTIL* and WCS120-*TaIRI-2*, respectively (Fig. 3), with the latter giving the highest cryopreservation activity in rat hepatocytes. Therefore, the cryopreservation potential of WCS120-*TaIRI-2* and WCS19-*TaTIL* recombinant proteins was further investigated.

The long-term cryopreservation potential of wheat proteins was also evaluated. The viabilities of hepatocytes that were cryopreserved with crude or partially purified WPEs for 4 years were similar to values obtained after 7 days of freezing (data not shown). When recombinant wheat proteins were used as cryopreservants, viabilities after 2 years were equivalent to those obtained in cells that had been cryopreserved for 7 days (data not shown).

### **Plating Efficiency, Adherence, and Morphology of Cryopreserved Rat Hepatocytes**

The ability of thawed cells to survive in culture is one of the most important criteria for successful cryopreservation of hepatocytes. Thawed hepatocytes were seeded and plating efficiency was assessed after 3 h and 24 h in culture, relative to non-cryopreserved hepatocytes (100 %). After 3 h in culture, plating efficiencies of thawed hepatocytes cryopreserved with SulWPE, AcWPE, WCS19-*Ta*TIL and WCS120-*Ta*IRI-2 (range from 76.4 to 77.4%), were higher than for the optimized DMSO standard (64.9 %) (Table I). After 24 h, plating efficiencies ranged from 70.3 to 74.3% for thawed hepatocytes that were cryopreserved with SulWPE, AcWPE, WCS19-*Ta*TIL and WCS120-*Ta*IRI-2, compared to 50 % for those cryopreserved with DMSO (Table I). These findings demonstrate that hepatocyte plating efficiencies were superior in the presence of purified WPEs and recombinant proteins mixtures, compared to the DMSO standard.

Morphological analysis showed that fresh cells were spread out after 24 h in culture, whereas cryopreserved cells maintained a round shape (Fig. 4). However, cell to cell contacts were observed for fresh hepatocytes and those cryopreserved with SulWPE, AcWPE, WCS19-*Ta*TIL and WCS120-*Ta*IRI-2, but were essentially absent for DMSO-cryopreserved hepatocytes (Fig. 4). Cells that were cryopreserved with wheat proteins appeared to be more clustered than those cryopreserved with DMSO. The presence of cell to cell contacts (Fig. 4) and higher attachment efficiencies (Table I) of cells cryopreserved with wheat proteins, relative to DMSO, suggested a better conservation of membrane integrity. Furthermore, our data indicate that hepatocytes cryopreserved with purified wheat proteins, rather than DMSO, exhibit properties of viability and adherence that are much closer to those of fresh cells.

Clinical transplantation of hepatocytes requires good viability and maximal attachment efficiency of cryopreserved hepatocytes. Compared to traditional cryopreservation protocols, our cryopreservative agent allows superior post-cryopreservation recovery in terms of cell-cell and cell-matrix contacts, which are essential for the functional hepatic architecture (Li, 2007; Li *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 2006a; Terry *et al.*, 2006b; Terry *et al.*, 2006c; Zvibel *et al.*, 2002). Our protocol for cryopreservation of hepatocytes could therefore be useful for clinical transplantation of patients afflicted with acute hepatic failure or metabolic problems.

### **Metabolic Activities of Cryopreserved Rat Hepatocytes**

CYP450 activity is the most labile function of the hepatocyte and hence is a good marker for evaluating hepatospecific functions. The functions of CYP450 isoforms allow evaluation of the capacity of hepatocytes to biotransform xenobiotics and to induce new protein synthesis of CYP450 isoforms. To demonstrate that cryopreserved hepatocytes retain their metabolic function, we measured the basal activities of 4 important CYP isoforms in suspensions of cryopreserved cells, immediately after thawing. The basal activities of CYP 3A1/2, CYP 2D2, CYP 1A1/2 and CYP 2C6 in cells cryopreserved with SulWPE, AcWPE and recombinant proteins were similar to that in freshly isolated hepatocytes (Table II, Fig. S1). However, when hepatocytes were cryopreserved with DMSO, the basal activities of CYP 2D2 and CYP 3A1/2 isoforms were decreased, whereas CYP 1A1/2 and CYP 2C6 were increased, when compared to fresh hepatocytes (Table II, Fig. S1). These results imply that DMSO could possibly inhibit isoforms CYP 2D2 and 3A1/2 and induce isoforms CYP 1A1/2 and 2C6. Our findings show that cryopreservation of hepatocytes with SulWPE, AcWPE and recombinant wheat proteins is clearly more efficient compared to DMSO, since levels of basal activity of the 4 CYP450 isoforms after thawing were similar to that of fresh hepatocytes.

### **Induction of Cytochrome P450 Isoforms in Cryopreserved Rat Hepatocytes**

Subsequently, we investigated the induction of CYP activities in hepatocytes cryopreserved with WPEs, compared to fresh cells and those cryopreserved with DMSO. Following cryopreservation with SulWPE, AcWPE and recombinant proteins, hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. They were then maintained in culture for a further 2 days, either with or without inducers of CYP450 activity.

The rates of induction of CYP 3A1/2, CYP 2D2 and CYP 2C6 activities in hepatocytes cryopreserved with SulWPE, AcWPE and recombinant proteins were similar to that obtained in freshly isolated cells (Table III, Figs. S2, S3, S5). For CYP 1A1/2, the rate of induction of activity in hepatocytes cryopreserved with wheat proteins was 15% higher than that obtained in fresh cells (Table III, Fig. S4). However, when DMSO-cryopreserved hepatocytes were maintained in culture, the rates of induction of 3A1/2 and 2C6 activities were 20 to 27% lower, while that of isoform 2D2 was 80% lower (Table III, Figs. S2-S5). The rate of induction increased by 55% for isoform 1A1/2, compared to fresh cells.

The rates of induction of CYP450 activities for the 4 isoforms were compared between hepatocytes cryopreserved with non-purified WPEs and freshly isolated cells. The rates of induction of the CYP450 isoforms in monolayer cultures of hepatocytes cryopreserved with non-purified WPEs were similar to those in fresh cells (unpublished observations). For cells in suspension, rates of induction of CYP 2C6 and 1A1/2 were increased by about 25%, when hepatocytes were cryopreserved with non-purified WPEs. The present study demonstrates that induction of CYP450 activity for the 4 isoforms in hepatocytes that were cryopreserved with SulWPE, AcWPE and recombinant wheat proteins was similar to that in freshly isolated cells, when cells were analysed both in suspension and in monolayer culture. Therefore, the

SulWPE, AcWPE and recombinant proteins appear to be more suitable for cryopreservation of hepatocytes when compared to DMSO.

Several mechanisms have been proposed for cryopreservation-induced cellular damage (Baust *et al.*, 2001; Karlsson et Toner, 1996; Terry *et al.*, 2006b). Intracellular ice formation is known to inflict damage during cryopreservation of many cell types, including hepatocytes (Karlsson *et al.*, 1993). In fact, cell membrane damage and physical cell rupture that occur during cryopreservation have been attributed to intracellular ice crystal formation and increased solute levels. Furthermore, extracellular ice surrounding cells can cause mechanical stress as well as cell deformation (Karlsson et Toner, 1996). Indeed, electron microscope studies revealed ultrastructural changes in the plasma membrane caused by mechanical stress due to the formation of extracellular ice (Fujikawa et Miura, 1986). Furthermore, the extracellular ice is essential for the initiation of ice formation inside cells. Cryopreservation also causes the activation of apoptotic and necrotic stress pathways, which leads to a decline in cell viability and function (Terry *et al.*, 2006b). The initiation of apoptosis after cryopreservation appears to be linked to mitochondrial damage.

The higher capacity of recombinant proteins to protect cells against freezing damage during cryopreservation, compared to DMSO, could be related to their native functions in wheat. WCS120 is a dehydrin that could possibly coat essential cellular proteins and protect them against conformational changes or agglomeration during freezing or dehydration (Houde *et al.*, 1995). Less is known about the function of WCS19, which appears to play a role in the enhancement of freezing tolerance (N'Dong *et al.*, 2002). TaIRI-2 is a gene that is up-regulated during cold acclimation in freezing-tolerant cereals, (Sidebottom *et al.*, 2000; Tremblay *et al.*, 2005). Its product is an apoplastic protein that has an extracellular function in wheat by

inhibiting the growth of ice crystals (Tremblay *et al.*, 2005). The ability of the *TaIRI-2* protein to inhibit the growth of ice crystals at the extracellular level would also decrease intracellular ice formation, which is likely to contribute to improved survival and protection of the plasma membrane during the cryopreservation of hepatocytes.

*TaTIL* is a plant lipocalin associated with the plasma membrane in freezing tolerant plants. Functional studies revealed that this protein is involved in protecting plant cells against oxidative stress caused by freezing. Thus, *TaTIL* is likely to protect the plasma membrane from cryopreservation-induced membrane damage (Charron *et al.*, 2005; Frenette Charron *et al.*, 2002). Oxidative stress has been proposed as a major mechanism of cell death during cryopreservation. Several studies have shown that cryopreservation decreases antioxidant defenses in hepatocytes. It was reported that cryopreservation of monolayers of rat hepatocytes using DMSO led to a 50% decrease in intracellular reduced glutathione (GSH) levels, along with a loss of glutathione synthetase expression (Stevenson *et al.*, 2007). Glutathione synthetase is a critical enzyme that is essential for GSH synthesis. The addition of vitamin E and vitamin C during cryopreservation improved GSH levels, but not glutathione synthetase activity. The decreased ability to synthesise GSH would result in increased susceptibility of cryopreserved hepatocytes to damage inflicted by oxidative stress and other toxic insults. Preincubation of rat and human hepatocytes with  $\alpha$ -lipoic acid prior to cryopreservation improved viability, LDH retention, attachment efficiency and albumin synthesis (Terry *et al.*, 2006c). This compound has antioxidant properties by acting as a free radical scavenger, a metal chelator and increasing GSH status (Bustamante *et al.*, 1998), which suggests that  $\alpha$ -lipoic acid could protect cell membranes against oxidative damage during cryopreservation.

In conclusion, this study demonstrates that the SulWPE, AcWPE and recombinant wheat proteins are efficient cryopreservation agents for hepatocytes. The viability, adherence and morphology of cells cryopreserved with SulWPE, AcWPE and

recombinant proteins were similar to fresh cells. The hepatocytes retained their metabolic activities and their ability to respond to CYP inducers in a manner similar to fresh cells. The SulWPE, AcWPE and recombinant proteins are non-toxic natural products that are economical and easy to prepare. They are efficient universal cryoprotectants that could replace DMSO, which has severe limitations due to cellular toxicity. However, it will be of interest to identify and to elucidate the functions of the specific protein(s) that confer these beneficial cryoprotective properties.

Table I Attachment efficiency of rat hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins.

<sup>3</sup> Cryopreservation agent	<sup>1,2</sup> Attachment efficiency (%) - 3 h	<sup>1,2</sup> Attachment efficiency (%) - 24 h
None – fresh cells	100 ± 0.5	100 ± 2.4
DMSO	64.9 ± 1.7	50.3 ± 4.1
SulWPE (41-80%)	76.4 ± 1.4	72.3 ± 2.5
AcWPE	76.5 ± 1.3	70.3 ± 2.4
WCS19- <i>Ta</i> TIL	77.4 ± 1.8	74.3 ± 2.8
WCS120- <i>Ta</i> IRI-2	77.2 ± 1.7	73.3 ± 2.6

<sup>1</sup>Attachment efficiency was evaluated by LDH activity in freshly isolated and cryopreserved hepatocytes after 3 h and 24 h in culture. Data are expressed as mean ± SEM from three different experiments.

<sup>2</sup>Data are normalised to the fresh hepatocyte control (100%). The absolute value for attachment efficiency in the control after 3 h was 77.3%.

<sup>3</sup>Cryopreservants used were 15% DMSO + 50 % FBS (DMSO), SulWPE (20 mg), AcWPE (20 mg), WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg) or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg).



Table II Activities of cytochrome P450 isoforms in suspensions of hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins.

<sup>2</sup> Cryopreservation agent	CYP Isoform ( <sup>1</sup> ratio relative to fresh hepatocytes)			
	3A1/2	2D2	1A1/2	2C6
None - fresh cells	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05
DMSO	0.60 ± 0.03	0.29 ± 0.01	1.41 ± 0.07	1.26 ± 0.06
SulWPE (41-80%)	1.06 ± 0.05	1.08 ± 0.05	1.05 ± 0.05	1.04 ± 0.05
AcWPE	1.04 ± 0.10	1.06 ± 0.05	1.05 ± 0.08	1.04 ± 0.08
WCS19- <i>Ta</i> TIL	1.05 ± 0.10	1.07 ± 0.05	1.04 ± 0.08	1.04 ± 0.08
WCS120- <i>Ta</i> IRI-2	1.05 ± 0.10	1.08 ± 0.05	1.04 ± 0.08	1.04 ± 0.08

<sup>1</sup>Activities of CYP isoenzymes in suspensions of cryopreserved hepatocytes are relative to that of fresh hepatocytes (normalised to 1.00 ± 0.05).

<sup>2</sup>Cryopreservants used were 15 % DMSO + 50 % FBS (DMSO), SulWPE (20 mg), AcWPE (20 mg), WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg) or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg).

Table III Rates of induction of activities of cytochrome P450 isoforms in monolayer cultures of hepatocytes following cryopreservation with purified WPEs and recombinant wheat proteins.

<sup>2</sup> Cryopreservation agent	CYP Isoform ( <sup>1</sup> ratio relative to fresh hepatocytes)			
	3A1/2	2D2	1A1/2	2C6
None - fresh cells	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05
DMSO	0.82 ± 0.04	0.20 ± 0.10	1.55 ± 0.77	0.73 ± 0.04
SulWPE (41-80%)	0.98 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.15 ± 0.06	0.97 ± 0.05
AcWPE	0.98 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.15 ± 0.06	0.97 ± 0.05
WCS19- <i>Ta</i> TIL	0.98 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.16 ± 0.06	0.94 ± 0.05
WCS120- <i>Ta</i> IRI-2	0.98 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.15 ± 0.06	1.00 ± 0.05

<sup>1</sup>Rates of induction of activities (Induced/non-induced) of CYP isoenzymes in monolayer cultures of cryopreserved cells are relative to that of fresh hepatocytes (normalised to 1.00 ± 0.05).

<sup>2</sup>Cryopreservants used were 15 % DMSO + 50 % FBS (DMSO), SulWPE (20 mg), AcWPE (20 mg), WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg) or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg).

## 7.6 FIGURES LEGENDS

Figure 1. Cryopreservation potential of AcWPE and SulWPE in isolated rat hepatocytes.

Viability of hepatocyte suspensions ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) after 7 days of freezing was evaluated with calcein/PI by flow cytometry. Hepatocytes were frozen in WME supplemented with: 10 % FBS (WME), or 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of WPE, or 20 mg and 40 mg of AcWPE, or 20 mg of SulWPE (saturation at 40 % (21-40 %), 60 % (41-60 %) and 80 % (61-80 %)). Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of WPEs in at least four independent experiments with different cell preparations (n = 36).

Figure 2. Cryopreservation potential of individual wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes.

Viability of hepatocyte suspensions ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) after 7 days of freezing was evaluated with calcein/PI. Hepatocytes were frozen in WME supplemented with 1, 2, 5, 10, 20 and 30 mg of different wheat recombinant proteins (WCS120, WCS19, WCOR410, *TaTIL* and *TaIRI-2*). It should be noted that 20 and 30 mg quantities of certain proteins were not tested since they were too viscous. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of recombinant proteins in at least four independent experiments with different cell preparations (n = 36).

Figure 3. Cryopreservation potential of combinations of wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes.

Viability of hepatocyte suspensions ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) after 7 days of freezing was evaluated with calcein/PI. Hepatocytes were frozen in WME supplemented with combinations of two different wheat recombinant proteins. Quantities of proteins were: 10 mg of WCS120, 5 mg of WCS19, 20 mg of WCOR410, 20 mg of *TaTIL* and 30 mg of *TaIRI-2*. Data (mean  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of three different preparations of recombinant proteins in at least four independent experiments with different cell preparations (n = 36).

Figure 4: Cellular morphology of cryopreserved hepatocytes.

Cellular morphology was visualized 24 h after seeding thawed rat hepatocytes following cryopreservation for 7 days in WME supplemented with: 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or WCS19-*TaTIL* (5 mg/20 mg), or WCS120-*TaIRI-2* (10 mg/30 mg), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE. Freshly isolated hepatocytes served as reference (FRESH). Hepatocytes ( $250 \times 10^3$  cells/mL) were visualized by microscopy (magnification 100X). Photographs are from one representative experiment, which was repeated at least three times.

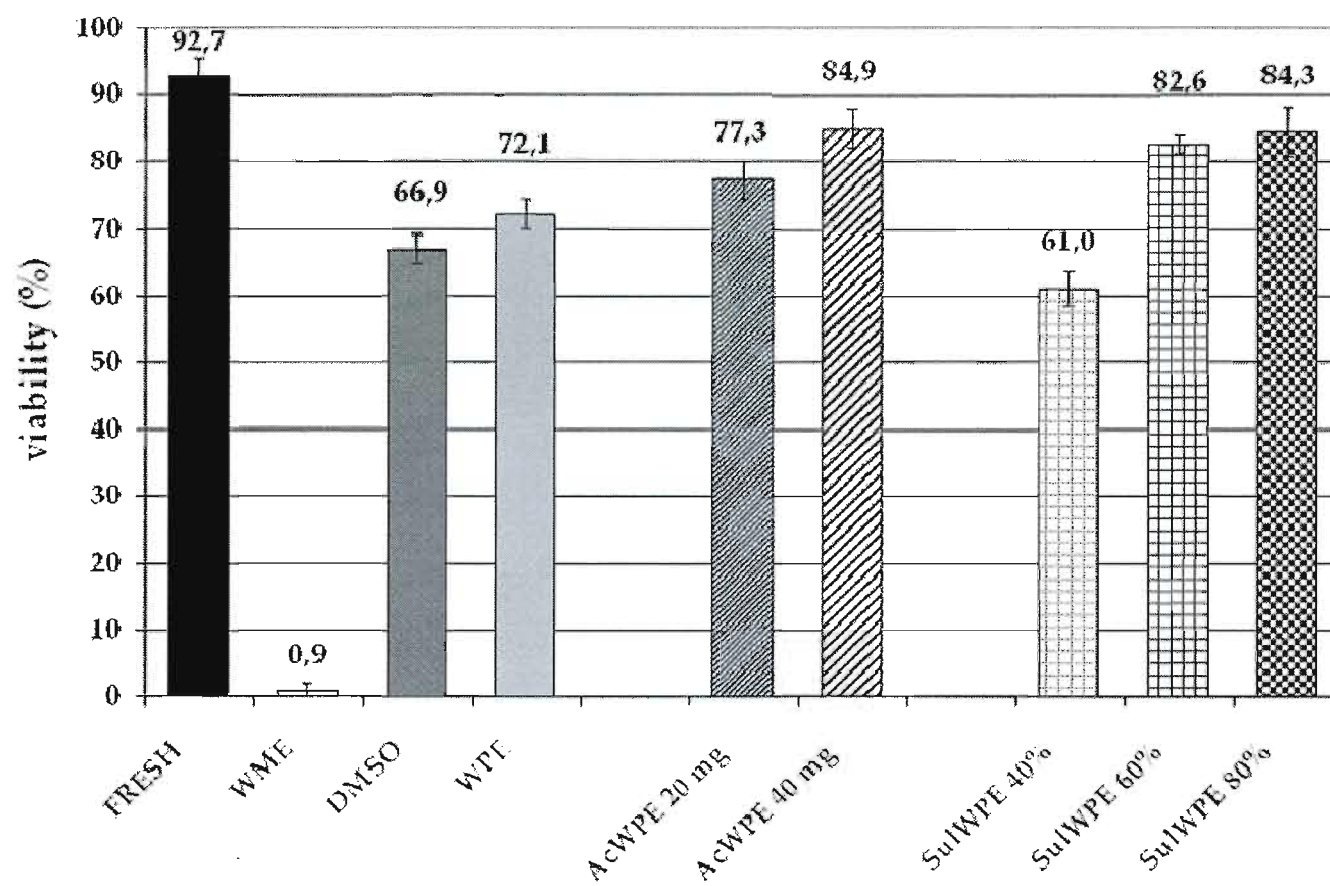
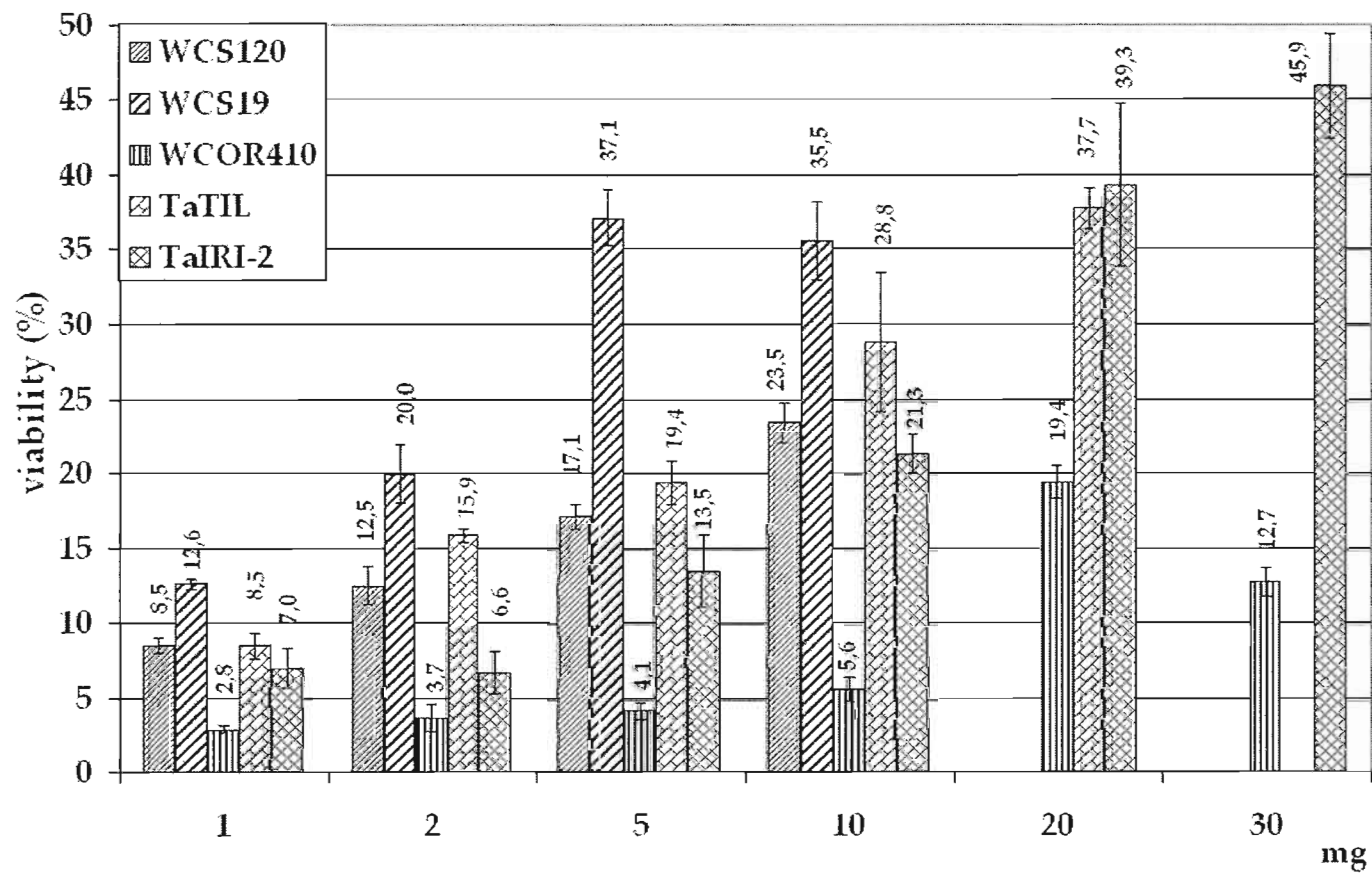
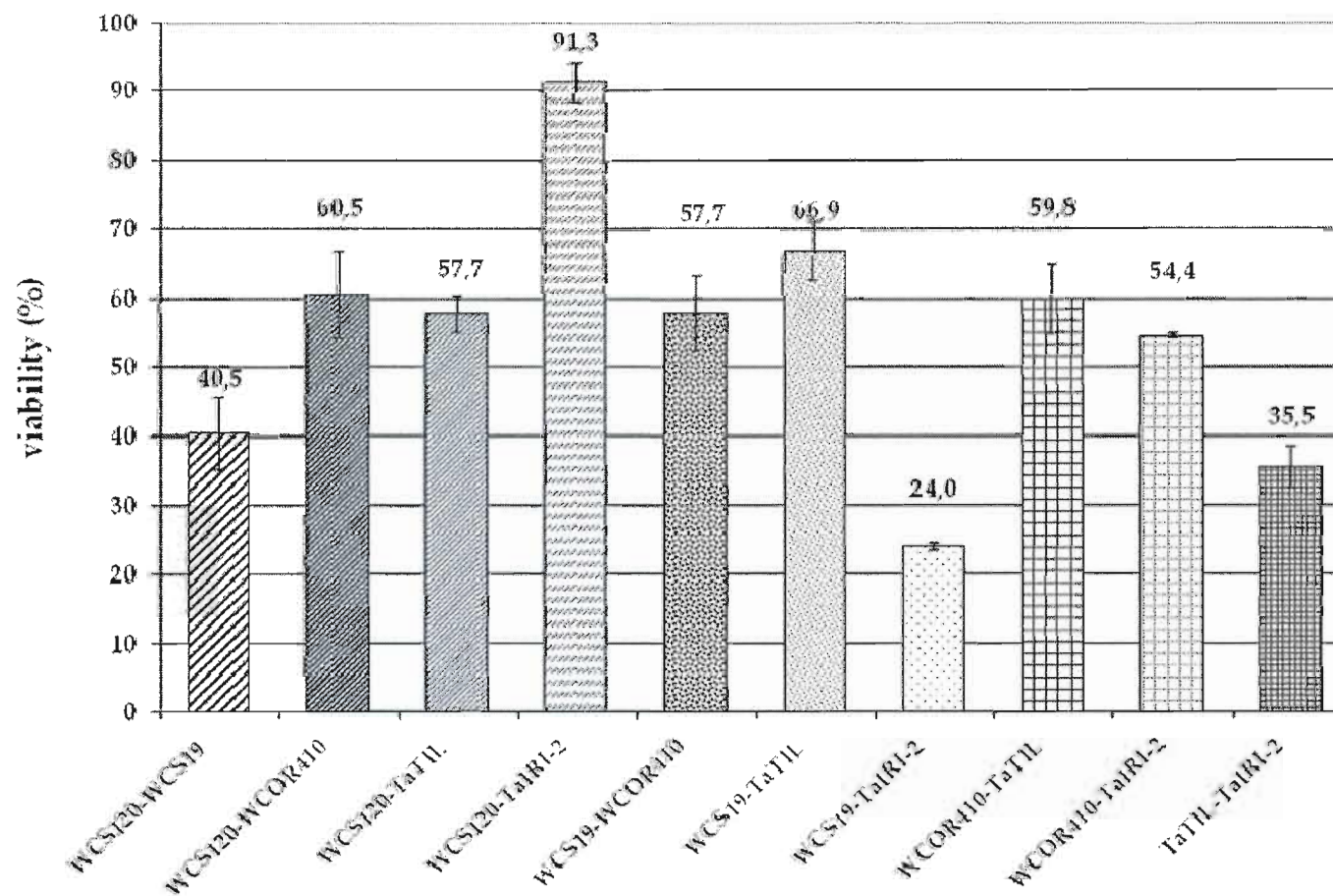


Figure 1 Cryopreservation potential of AcWPE and SulWPE in isolated rat hepatocytes.



**Figure 2** Cryopreservation potential of individual wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes.



**Figure 3** Cryopreservation potential of combinations of wheat recombinant proteins in isolated rat hepatocytes.

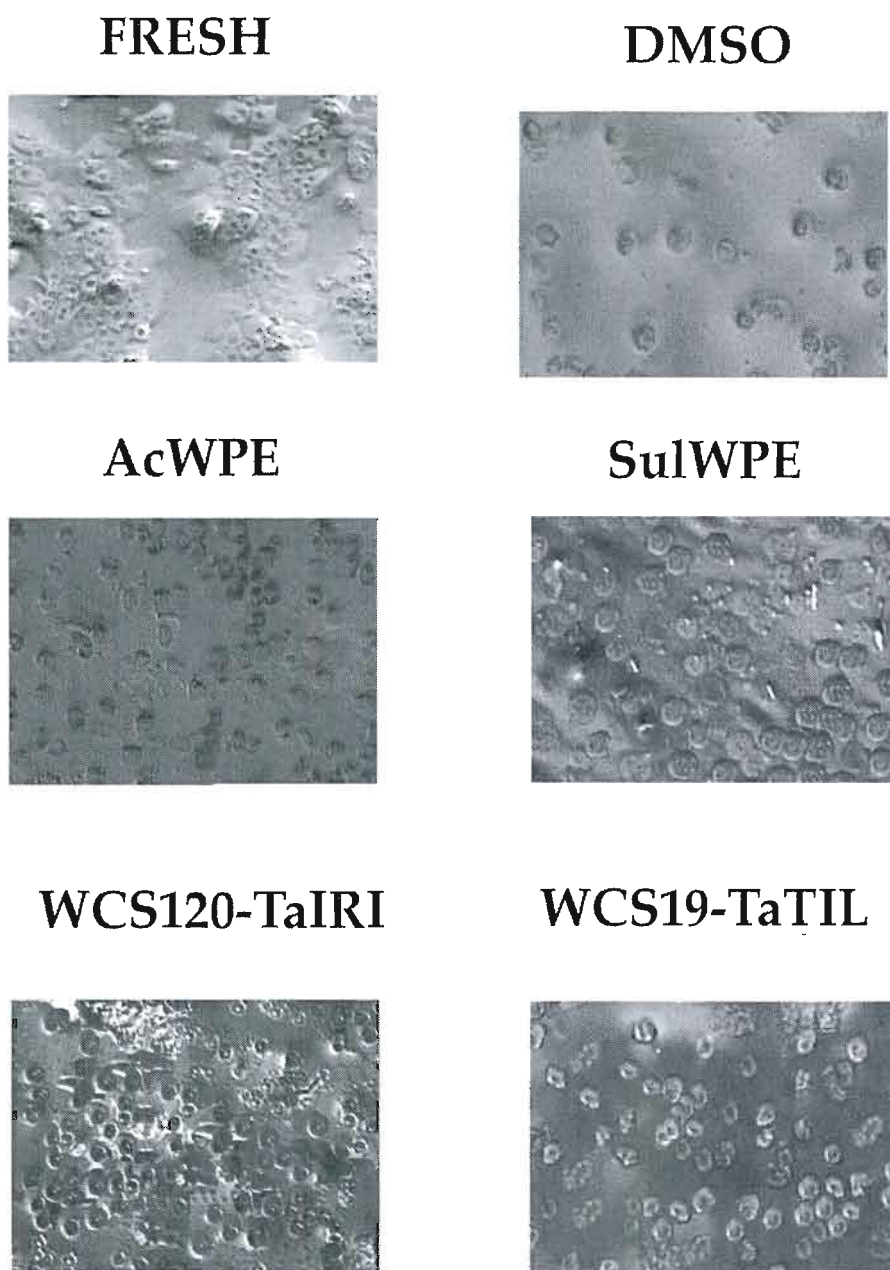


Figure 4 Cellular morphology of cryopreserved hepatocytes.



## 7.8 SUPPLEMENTAL DATA LEGENDS

Figure S1 Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with: 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE, or WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg), or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg). Activity of the 4 CYP450 isoforms was evaluated in cell suspensions immediately post-thaw using the following fluorescent probes: A) CYP 3A1/2 (probe DFB), B) CYP 2D2 (probe AMMC), C) CYP 1A1/2 (probe CEC) and D) CYP 2C6 (probe MFC). Freshly isolated hepatocytes (Fresh) served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n = 8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Figure S2 Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP 3A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with: 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE, or WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg), or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg). Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Dexamethasone was then used to induce activity during 48h. A) Activity and B) rate of induction (induced/non-induced) of CYP 3A1/2 were evaluated using DFB in cells in culture. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72 h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n = 8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure S3 Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP 2D2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

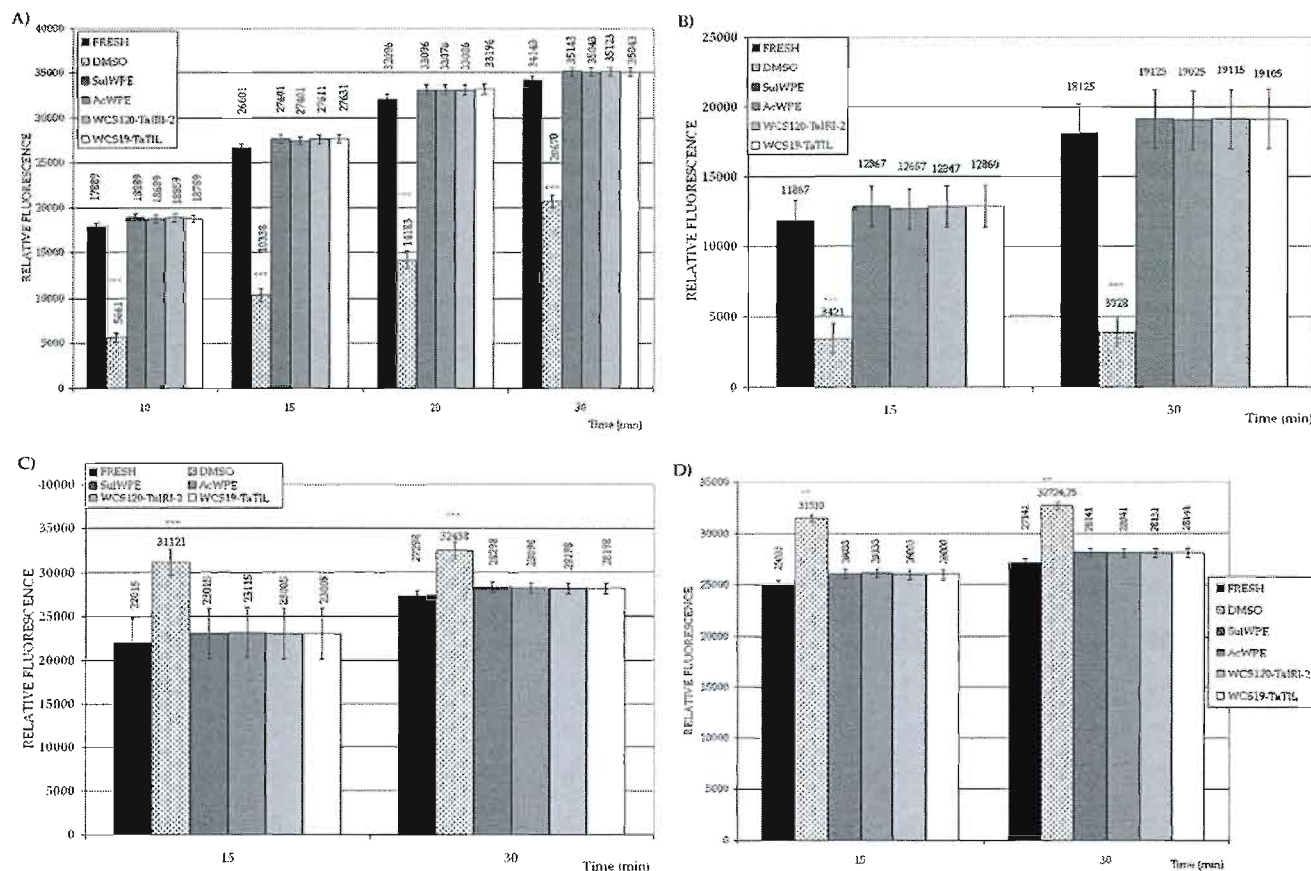
Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with: 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE, or WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg), or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg). Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Dextromethorphan was then used to induce activity during 48h. A) Activity and B) rate of induction (induced/non-induced) of CYP 2D2 were evaluated using AMMC in cells in culture. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72 h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure S4 Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP 1A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with: 15% DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE, or WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg), or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg). Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Benzo-a-pyrene was then used to induce activity during 48h. A) Activity and B) rate of induction (induced/non-induced) of CYP 1A1/2 were evaluated using CEC in cells in culture. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72 h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . NI= non-induced and I=induced.

Figure S5 Metabolic activity of cytochrome P450 isoform CYP 2C6 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

Rat hepatocytes were cryopreserved for 7 days in WME supplemented with: 15 % DMSO and 50 % FBS (DMSO), or 20 mg of SulWPE (saturation 41-80 %), or 20 mg of AcWPE, or WCS19-*Ta*TIL (5 mg/20 mg), or WCS120-*Ta*IRI-2 (10 mg/30 mg). Hepatocytes were thawed and seeded in culture for 24 h. Phenobarbital was then used to induce activity during 48h. A) Activity and B) rate of induction (induced/ non-induced) of CYP 2C6 were evaluated using MFC in cells in culture. Freshly isolated hepatocytes (Fresh) were cultured for 72 h and served as reference. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements from four experiments with different cell preparations (n=8). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . NI= non-induced and I=induced.



**Figure S1 Basal activity of 4 cytochrome P450 isoforms in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.**

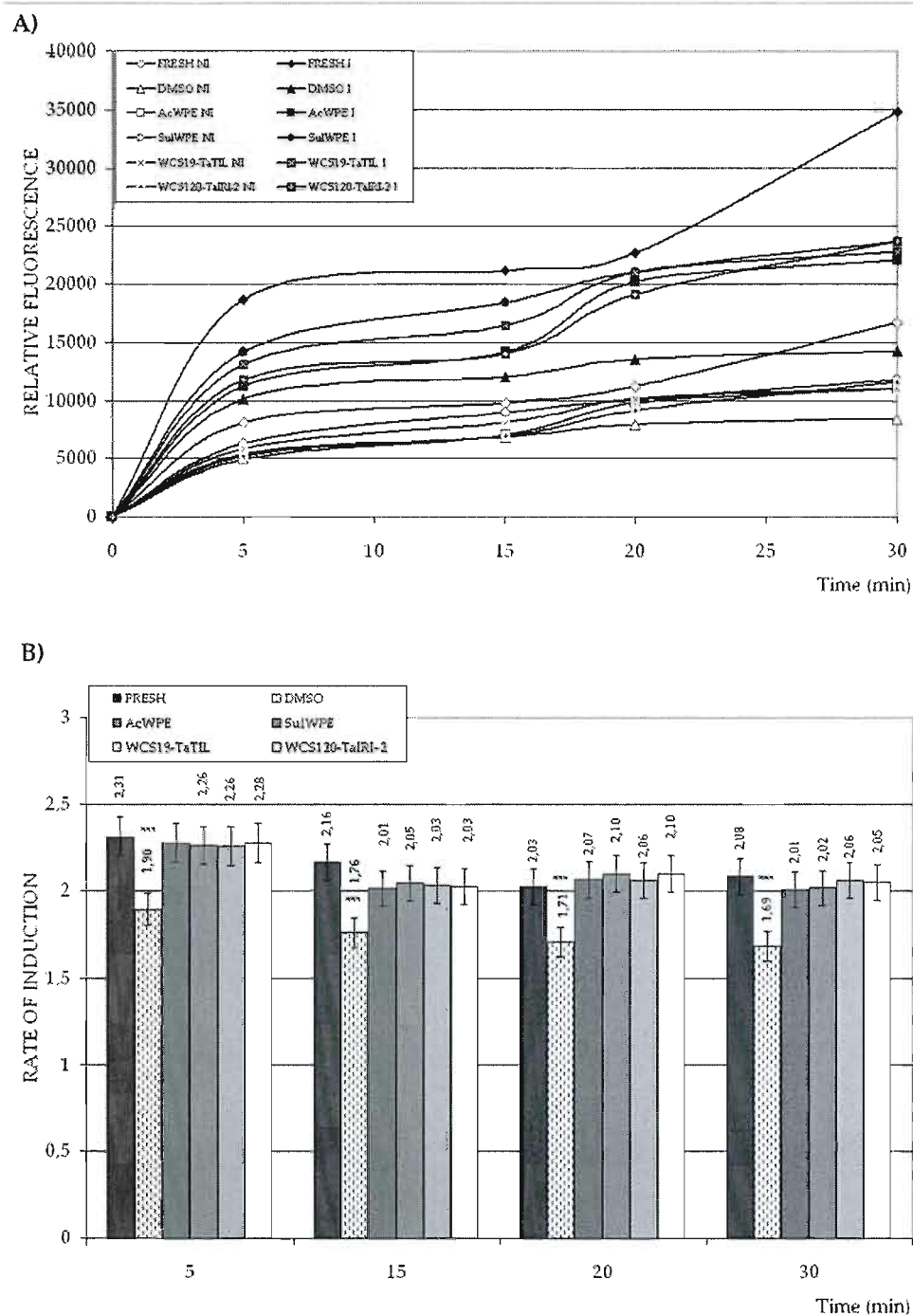


Figure S2 Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 3A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

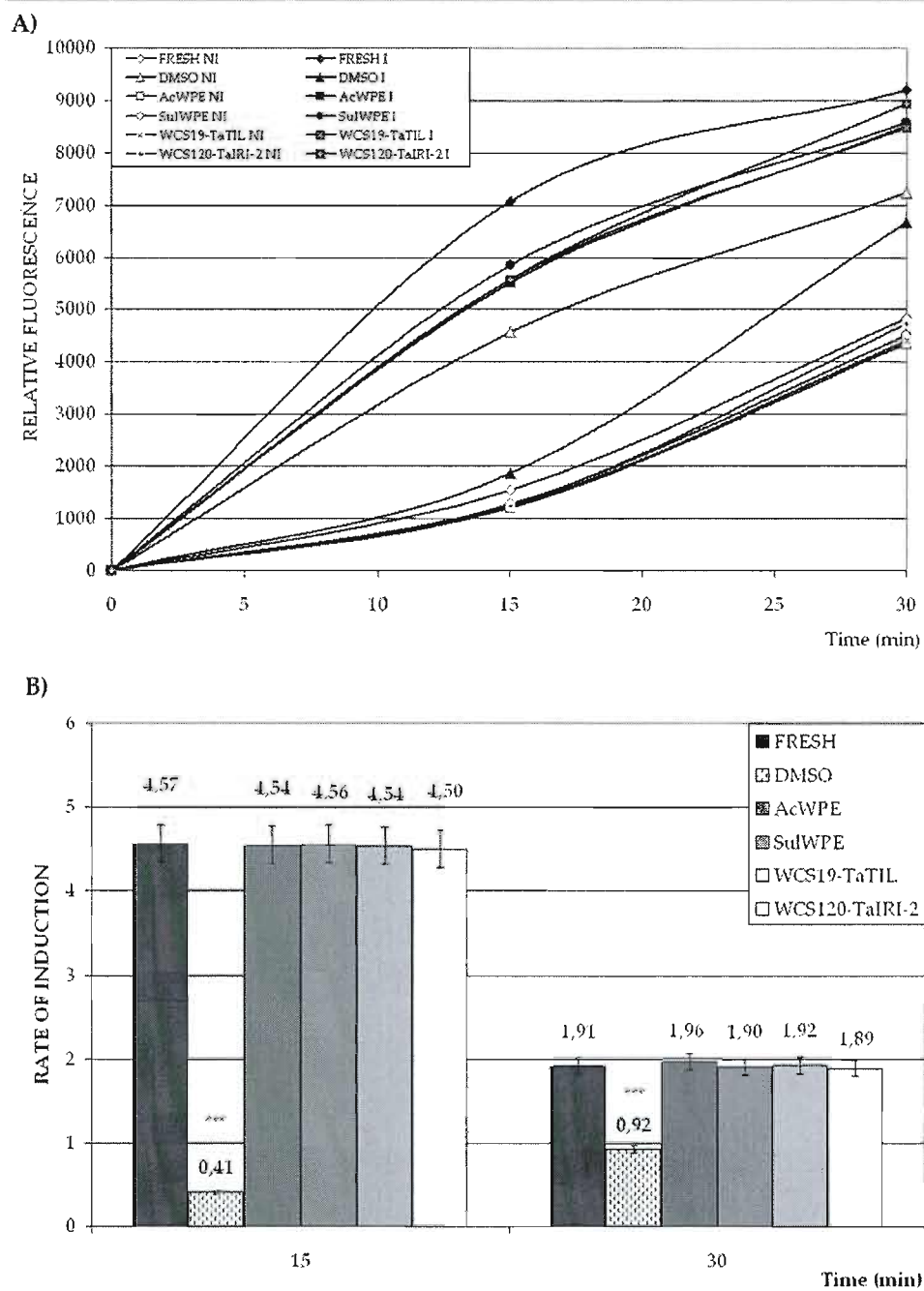


Figure S3 Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 2D2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.

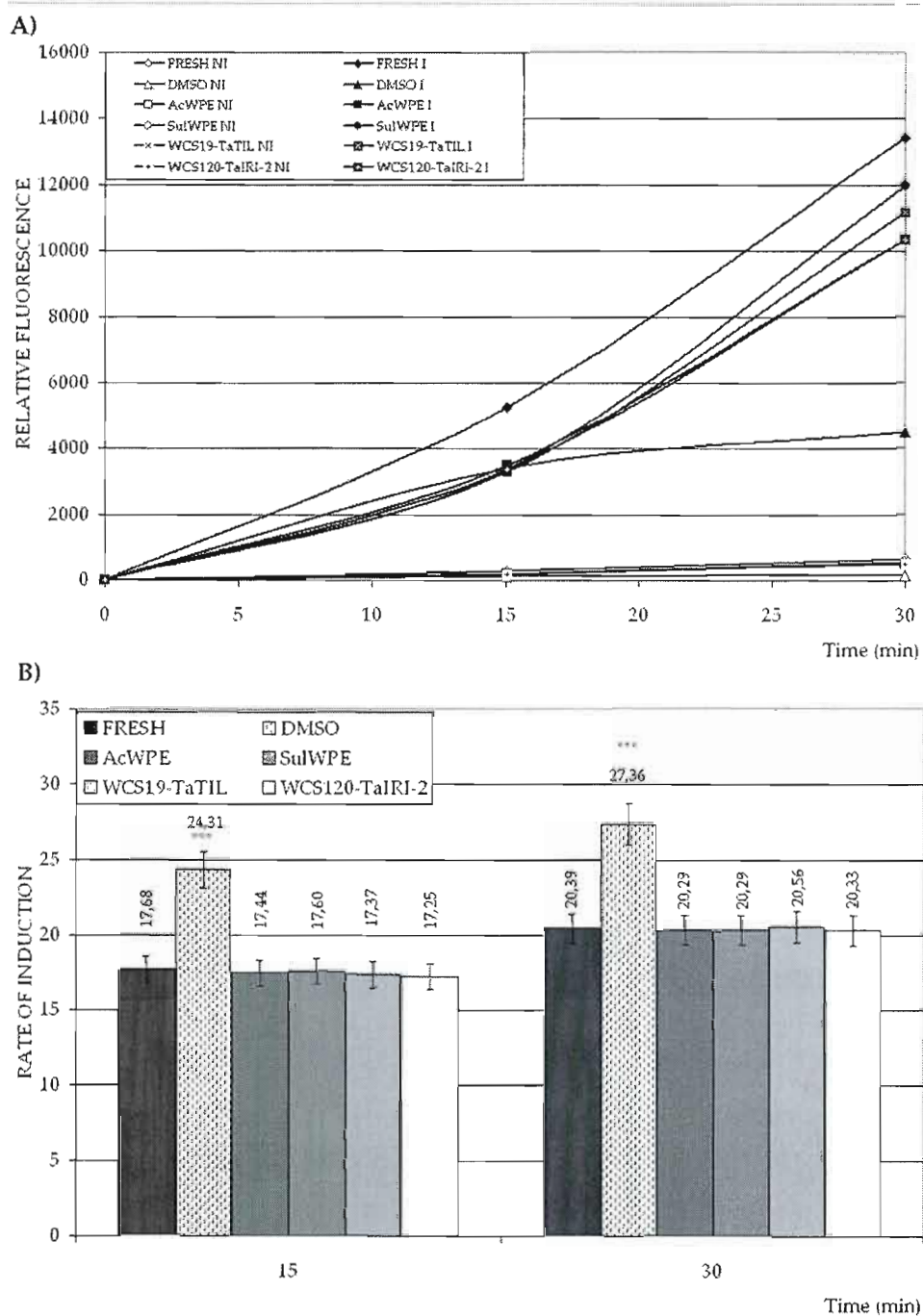


Figure S4 Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 1A1/2 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.



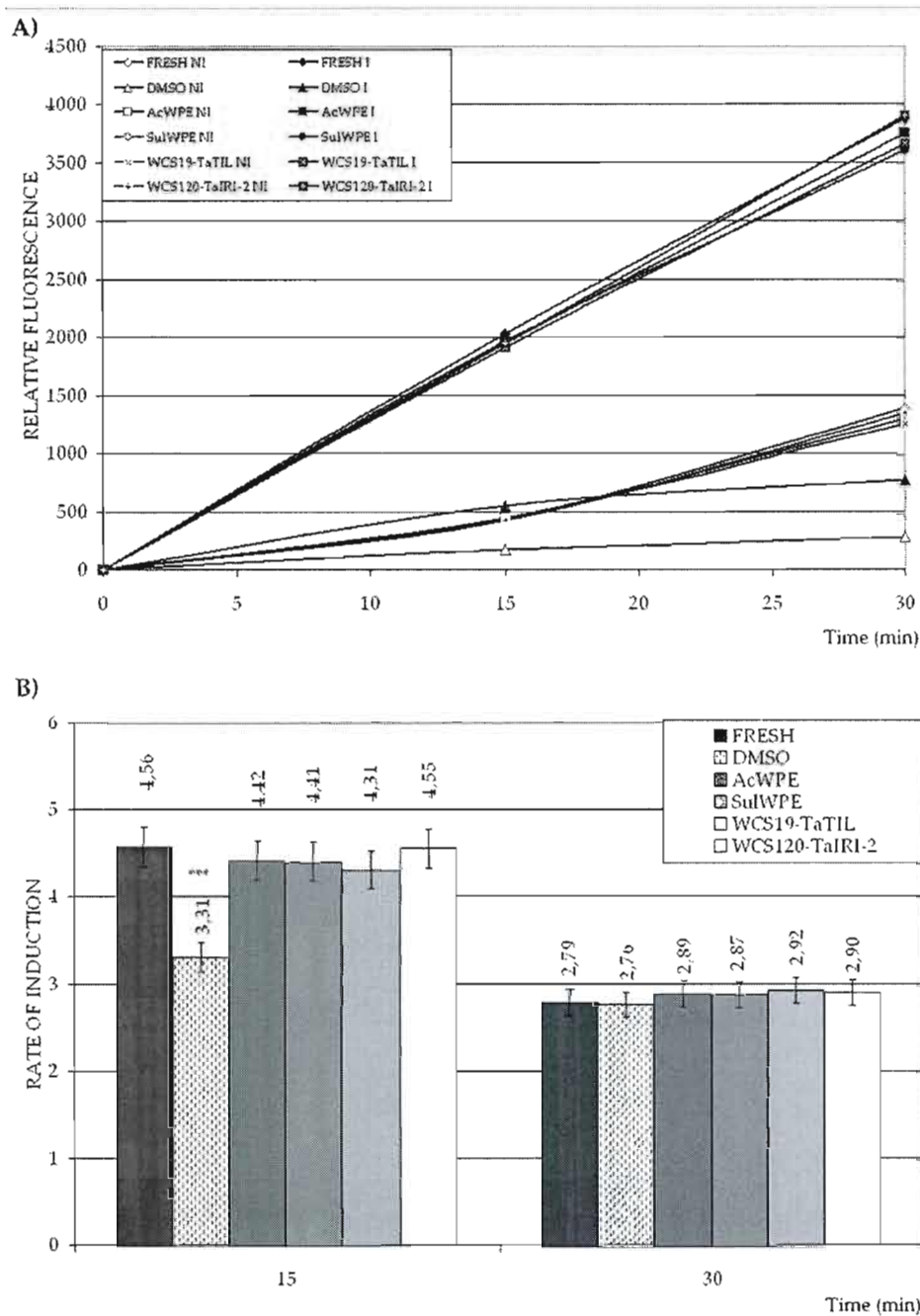


Figure S5 Metabolic activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP 2C9 in cryopreserved hepatocytes: effects of SulWPE, AcWPE and recombinant proteins.



## **CHAPITRE VIII**

### **DISCUSSION**

#### **LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX CRYOPROTECTEURS**

Les hépatocytes cryoconservés de haute qualité sont d'une valeur considérable pour des investigations dans les domaines de l'hépatologie, de la pharmacologie, et de la toxicologie (Powis *et al.*, 1987; Santone *et al.*, 1989; Zaleski *et al.*, 1993). L'utilisation des hépatocytes cryoconservés d'une seule source permettrait des investigations sur des groupes bien définis de cellules. En outre, les mêmes cellules pourraient alors être utilisées dans différents laboratoires, offrant ainsi l'avantage d'un étalonnage expérimental. Par ailleurs, les hépatocytes cryoconservés de haute qualité pourraient également être un avantage pour le développement de procédés bioartificiels hépatiques ainsi que pour la transplantation clinique qui dépendent énormément d'unités fonctionnelles aisément disponibles et de bonne qualité (Gerlach *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1993; Terry *et al.*, 2006b; Uchino *et al.*, 1991).

Les principaux problèmes rencontrés avec les méthodes classiques de cryoconservation des hépatocytes sont les faibles taux de survie en culture ainsi que la diminution de leur intégrité métabolique et fonctionnelle ainsi que de leur adhérence. Les hépatocytes sont extrêmement sensibles aux dommages occasionnés lors des cycles de congélation et de dégel, même après l'addition de cryoprotecteurs classiques. Contrairement aux lignées cellulaires, les cultures primaires d'hépatocytes ne se divisent pas en culture sans l'addition de facteurs de croissance spécifiques. Des agents cryoprotecteurs, principalement le DMSO, sont actuellement utilisés pour protéger les cellules et les tissus contre la déshydratation provoquée par la formation de la glace intracellulaire pendant la congélation. Cependant, ils sont cytotoxiques et doivent être éliminés rapidement après décongélation (Fahy, 1986) sinon ils causent un stress osmotique qui affecte les fonctions cellulaires (Schneider et Mazur, 1987). En conséquence, les cellules cryoconservées ne représentent pas l'état métabolique normal d'une cellule ou d'un tissu et peut mener, lors de leur utilisation, à une interprétation incorrecte des résultats. Ainsi une méthode plus efficace de cryoconservation est nécessaire afin de diminuer les dommages cellulaires et fonctionnels occasionnés lors de la cryoconservation des hépatocytes.

Pour découvrir une alternative aux cryoprotecteurs actuellement utilisés, nous avons exploré l'utilisation des substances produites par les organismes qui survivent à des conditions de congélation. Les plantes, telle que le blé d'hiver, accumulent plusieurs composés qui assurent leur survie durant la congélation (Guy, 1990; Thomashow, 1990). Parmi ces composés, on retrouve des sucres, des acides aminés et des protéines telles que les protéines antigel (AFPs) et les déhydrines. Ces protéines ont la capacité de protéger les cellules contre la déshydratation provoquée lors de la congélation. Ces propriétés ont donc un avantage certain en vue d'une meilleure cryoconservation des hépatocytes.

Lorsque les plantes sont soumises à de basses températures, un processus nommé l'acclimatation au froid (CA), associé au développement de la tolérance à la congélation (FT), se produit. L'une des stratégies que les plantes résistantes au froid, telles que les plants de blé, utilisent pour tolérer les températures inférieures à 0 °C est l'accumulation de protéines associées à la congélation telles que des protéines antigels (AFPs) et des déhydrines (Breton *et al.*, 2000).

Les AFPs démontrent *in vitro* deux types d'activités. La première est la diminution non colligative de la température de congélation des solutés. La seconde est l'inhibition de la recristallisation de glace (IRI), qui est l'inhibition de la croissance de plus grands cristaux de glace aux dépens de plus petits cristaux (Knight *et al.*, 1984). En outre, les AFPs peuvent protéger les membranes cellulaires contre les dommages induits par le froid (Breton *et al.*, 2000). Les déhydrines sont hydrophiles, résistantes à la dénaturation par ébullition et possèdent des régions capables de former une hélice amphipatique. Ces propriétés peuvent leur permettre de protéger les cellules contre les dommages produits par le stress de la congélation, en stabilisant les protéines et les membranes au cours de la déshydratation causée par la congélation (Breton *et al.*, 2000).

Dans le premier article (Hamel *et al.*, 2006), nous avons exploré la capacité d'un extrait brut de protéines provenant de blé tolérant au gel (WPE), acclimaté (CA) ou non (NA) au froid, d'agir comme cryoprotecteur pour les hépatocytes de rats. Nos résultats démontrent clairement que 20 mg de NA WPE (68.4% viabilité) est aussi efficace que 15% DMSO supplémenté avec 50% SVF (62.5% viabilité) pour la cryoconservation des hépatocytes. Cependant, 20 mg de CA WPE donne une viabilité plus basse de l'ordre de 35%. Cette faible viabilité peut être causée par la présence de certains composés phénoliques qui sont connus pour s'accumuler durant l'acclimatation au froid ou par une hausse de l'osmolarité de l'extrait végétal. Néanmoins, l'activité cryoprotectrice est spécifique à l'extrait végétal puisque le BSA ou les protéines d'*E. coli* ne démontre pas cette activité.

Il est connu que les plants de blé acclimatés au froid accumulent plusieurs composés tels des sucres, des acides aminés et des protéines (AFPs, déhydrines) qui assurent la survie des plants de blé durant les gels hivernaux (Guy, 1990; Thomashow, 1990). Nous nous attendions à ce que l'extrait brut de blé acclimaté au froid nous donne une meilleure viabilité des cellules après dégel. L'obtention de résultats contradictoires en regard de nos hypothèses nous pousse donc à déterminer les composantes de l'extrait de blé qui confèrent ce potentiel cryoprotecteur.

Nous avons donc procédé à une purification partielle de l'extrait brut selon deux protocoles différents soit une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium ou une précipitation à l'acétone. La précipitation au sulfate d'ammonium est effectuée à divers % de saturation: 20-40 %, 41-60 %, 61-80 % et 81-100 %. La précipitation à l'acétone est effectuée pour sa part à 55 % (v/v). Ces extraits partiellement purifiés ont été testés pour leur capacité cryoprotectrice, 20 mg de protéines précipitées au sulfate d'ammonium (40, 60 et 80 % de saturation) donne des viabilités de l'ordre de 61, 82.64 et 84.34 %, respectivement. Le maximum de viabilité se situant entre un % de saturation de 41 et 80 %. Donc l'extrait partiellement purifié au sulfate

d'ammonium (SulWPE) est obtenu après une première précipitation à 40 % (cet extrait n'est pas conservé) suivi d'une seconde à 80 %. Les extraits précipités à l'acétone ont également été testés, 20 ou 40 mg d'AcWPE, donne des viabilités de l'ordre de 77.32 et 84.95 %, respectivement (Grondin *et al.*, 2008-c). Les deux extraits purifiés démontrent une plus grande capacité cryoprotectrice que la technique classique du DMSO ainsi que l'extrait brut de blé (WPE).

Afin de déterminer le contenu en protéines de l'extrait SulWPE et ainsi trouver les protéines potentiellement impliquées dans la cryoprotection, l'extrait a été purifié sur un tamis moléculaire (sephacryl S200) pour séparer les différentes protéines selon leur poids moléculaire. La fraction ayant démontré la plus grande activité cryoprotectrice fut caractérisée par spectroscopie de masse. Les analyses ont mis à jour la présence de 4 protéines d'intérêt soit : les sous-unités Alpha et Bêta de la chaperonine 60, la thioredoxine et la phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Le clonage de ces protéines a débuté. Une purification des protéines glycosylées sur Concanavaline A a également été effectuée sur l'extrait SulWPE. La fraction ayant la plus grande activité cryoprotectrice fut caractérisée par spectroscopie de masse. Cependant, aucune protéine n'a pu être ciblée par les analyses de spectroscopie de masse.

Plusieurs tests ont été effectués sur les extraits WPE, AcWPE et SulWPE. Une bonne viabilité après un cycle de gel/dégel est importante mais plusieurs autres paramètres doivent être observés. Pour que les cellules cryoconservées avec ces extraits puissent être utilisables en recherche, il est primordial qu'elles adhèrent en culture et conservent leurs fonctions hépatospécifiques.

Les échantillons cryoconservés avec les WPEs ont été soumis à plusieurs tests après leur mise en culture. Le premier test fut l'analyse de leur capacité d'adhésion et de leur morphologie en culture. Puisqu'il est reconnu que les hépatocytes cryoconservés

avec la technique classique possèdent une adhésion de seulement 50 % comparativement à une culture non cryoconservée (Hamel *et al.*, 2006), nous espérons que les WPEs permettraient un meilleur maintien de la capacité d'adhésion des hépatocytes. L'adhésion des cellules cryoconservées avec les WPEs est similaire aux cellules cryoconservées avec la technique classique (soit 50 % d'adhésion) (Hamel *et al.*, 2006). Bien que l'adhésion soit similaire pour les cellules cryoconservées avec le DMSO ou les WPEs, les hépatocytes cryoconservés avec les WPEs ont une morphologie cellulaire en culture plus similaire à celle de cellules fraîchement isolées. Les hépatocytes cryoconservés avec les WPEs effectuent des contacts cellules-cellules qui ne sont pas observés chez une culture de cellules cryoconservées avec la technique classique au DMSO.

Les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> articles démontrent toutefois que les extraits AcWPE et SulWPE permettent une meilleure adhésion des hépatocytes post-congélation. L'adhésion, après dégel (adhésion après 3 h en culture), des cultures de cellules cryoconservées avec les AcWPE et SulWPE est de 76 % comparativement à 65 % pour les cellules cryoconservées avec la technique classique au DMSO. Après 24 h en culture, les cellules cryoconservées avec AcWPE et SulWPE maintiennent une adhésion supérieure (70 %) aux cellules cryoconservées avec la technique classique ou les WPEs (environ 50 %) (Grondin *et al.*, 2008-a, 2008-c).

Tel qu'observé pour les cellules cryoconservées avec les WPEs, les analyses microscopiques démontrent que les cellules cryoconservées avec AcWPE et SulWPE retrouvent en culture une morphologie similaire aux cellules fraîches avec des contacts cellules-cellules. Ceci suggère donc une meilleure conservation de l'intégrité membranaire des cellules cryoconservées avec des extraits végétaux que pour celles cryoconservées avec la technique classique (Grondin *et al.*, 2008-a).

Le pouvoir cryoprotecteur de l'extrait dialysé de blé acclimaté étant équivalent à celui au blé non acclimaté, nous avons émis l'hypothèse que les protéines de tolérances au gel (FTP) n'étaient pas en quantité suffisante pour augmenter le potentiel cryoprotecteur de l'extrait acclimaté. Donc, pour déterminer si les FTPs ont un potentiel cryoprotecteur nous avons opté pour la production de protéines recombinantes. Cinq protéines augmentant de façon quantitative durant l'acclimatation au froid du blé d'hiver ont donc été ciblées, soient : WCS120, WCS19, WCOR410, *TaTIL* et *TaIRI-2*.

Les protéines d'acclimatation au froid du blé utilisées seules dans des essais de cryoconservation ne permettent pas d'obtenir des viabilités égales ou supérieures à la technique classique. Les meilleures viabilités obtenues sont de l'ordre de 23.46 % pour 10 mg de WCS120, 37.07 % pour 5 mg WCS19, 19.40 % pour 20 mg de WCOR410, 37.70 % pour 20 mg de *TaTIL* et de 45.94 % pour 30 mg de *TaIRI-2*. Cependant, lorsque ces protéines sont utilisées conjointement, nous obtenons des viabilités comparables ou supérieures à la technique classique (WCOR410-*TaIRI* (54.41 %), WCS120-*TaTIL* (57.68 %), WCS19-WCOR410 (57.73 %), WCOR410-*TaTIL* (59.81 %), WCOR410-WCS120 (66.52 %), WCS19-*TaTIL* (66.91 %) et WCS120-*TaIRI* (91.27 %)) (Grondin *et al.*, 2008-c).

En plus de maintenir une bonne viabilité, les duos de protéines permettent une adhésion cellulaire après dégel plus efficace que la technique classique ou les WPEs. Après 3 h en culture, environ 77 % des cellules cryoconservées avec les duos de protéines sont adhérentes comparativement à 65 % pour la technique classique et les WPEs. Après 24 h en culture, l'efficacité d'attachement est d'environ 70 %, soit équivalente à celle des cellules cryoconservées avec les AcWPE et SulWPE, comparativement à seulement 50 % pour les cellules cryoconservées avec la technique classique ou les WPEs (Grondin *et al.*, 2008-a, 2008-c).

Les analyses morphologiques par microscopie démontrent qu'après 24 h, en culture les cellules cryoconservées avec les duos de protéines demeurent plutôt rondes et ne s'étalent pas comme les cellules fraîches. Par contre, des contacts cellules-cellules et des regroupements de cellules sont observés tel que pour les cultures de cellules fraîches, alors que ces observations sont quasi inexistantes chez les cultures de cellules cryoconservées selon la technique classique avec le DMSO.

Une bonne viabilité et l'adhésion cellulaire ne suffisent cependant pas à caractériser les cellules cryoconservées. Il est nécessaire que les fonctions spécifiques des cellules le soient également. Plusieurs fonctions hépatospécifiques des cellules cryoconservées ont donc été testées.

Puisque l'une des étapes importantes du développement de nouvelles molécules en industrie pharmaceutique est la caractérisation des profils et de taux métaboliques, il est important de vérifier le maintien des fonctions métaboliques des hépatocytes cryoconservés. Nous avons précédemment démontré que le taux de sécrétion de l'albumine par les hépatocytes frais et cryoconservés montrait un modèle typique de la synthèse d'albumine dans les hépatocytes primaires *in vitro* (Hamel *et al.*, 2006) tel que décrit par d'autres laboratoires (Guillouzo *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2001a; Son *et al.*, 2004; Sosef *et al.*, 2005). Cependant, les taux de sécrétion de l'albumine par les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO sont inférieurs à ceux retrouvés dans les hépatocytes frais ou cryoconservés avec les WPEs (Hamel *et al.*, 2006). Ceci est probablement attribuable aux dommages provoqués par la congélation. Nous avons donc démontré l'avantage de l'utilisation des WPEs en tant qu'agents cryoprotecteurs.

Une seconde fonction importante des hépatocytes est la synthèse de l'urée. Celle-ci nécessite une grande quantité d'énergie des cellules et est un indicateur sensible du métabolisme énergétique des hépatocytes (Zaleski et Bryla, 1978). Les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO ont synthétisé de l'urée à un taux inférieur comparé à



celui des cellules fraîches ou cryoconservés avec les WPEs. En revanche, les hépatocytes cryoconservés avec les WPEs ont maintenu leur fonction de désintoxication de l'ammonium à un niveau semblable à celui des hépatocytes frais (Hamel *et al.*, 2006). Ces résultats nous démontrent le potentiel des WPEs à conserver intact les activités métaboliques primaires telles que la synthèse de protéines, l'expression de gènes hépatosécifiques, la transcription, ainsi que les voies de sécrétion.

Les cellules cryoconservées avec l'AcWPE et le SulWPE, étant disponibles en plus faible quantité, une fonction hépatosécifique impliquant une synthèse de protéines et une fonction de détoxification a été vérifiée. La capacité des hépatocytes frais et cryoconservés avec les WPE, AcWPE, SulWPE ou DMSO à répondre à des inducteurs des isoformes du cytochrome P450 a donc été étudiée. Le contenu en cytochrome P450 étant l'une des fonctions la plus labile dans les cultures d'hépatocytes (Grant *et al.*, 1985; Paine, 1990), et très sensible aux changements de l'environnement cellulaire, il permet donc une évaluation critique de la fonction des cellules après dégel. Pour une induction du cytochrome P450 (CYP), il doit y avoir une synthèse de novo de protéines. L'induction du CYP démontre donc le maintien de la capacité de synthèse de protéine, ou d'expression de gènes hépatosécifiques. Le CYP permet la détoxification des xénobiotiques, l'une des fonctions les plus importantes du foie. Dans l'industrie pharmaceutique, la fonction du CYP permet de déterminer la clairance d'une molécule d'intérêt ainsi que les métabolites secondaires potentiellement toxiques produits par cette molécule. Le maintien de CYP fonctionnel des hépatocytes est donc d'un intérêt considérable pour l'industrie pharmaceutique.

Dans le premier article, des hépatocytes frais et cryoconservés avec les WPEs ou DMSO ont été induits afin de déterminer le maintien de leur capacité de réponse aux inducteurs de CYP. Les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO maintiennent la plupart des activités métaboliques (Li *et al.*, 1999), aussi bien que leur capacité

d'induction des enzymes du métabolisme (Hengstler *et al.*, 2000a; Hengstler *et al.*, 2000b; Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005). Nous avons démontré que les cellules cryoconservées avec le DMSO répondent aux inducteurs du CYP1A1 et du CYP2B de manière similaire aux cellules fraîches, bien qu'avec une induction légèrement inférieure. L'induction de l'activité CYP a été corrélée à une augmentation du taux de synthèse de protéines CYP, en accord avec d'autres études (Madan *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999). Pour les hépatocytes cryoconservés avec les WPEs, nous avons observé le même taux d'induction de l'activité et de la synthèse protéique que pour les cellules fraîches. Encore une fois, cela démontre l'efficacité des WPEs comparativement à la technique classique pour cryoconserver les hépatocytes et maintenir leurs activités métaboliques au même taux que les cellules fraîches (Hamel *et al.*, 2006).

Dans le deuxième et quatrième article (Grondin *et al.*, 2008-b, 2008-c), l'analyse des isoformes du CYP a été élargi aux quatre principaux isoformes soient CYP3A, 1A1/2, 2D et 2C. Dans cette étude, chaque isoforme est induit avec l'un de ses inducteurs connus. Il semble que certains isoformes du CYP soient plus sensibles à la cryoconservation. Les résultats démontrent que le maintien des isoformes est plus stable chez les cellules cryoconservées avec les AcWPE, SulWPE et les duos de protéines que chez les cellules cryoconservées avec le NA WPE. Les cellules cryoconservées avec les extraits de blé (brut ou partiellement purifiés) et avec les duos de protéines maintiennent toutefois mieux les fonctions des CYP que les cellules cryoconservées avec la technique classique.

En conclusion, les extraits de blé (bruts ou partiellement purifiés) et les duos de protéines sont de meilleurs cryoprotecteurs que le DMSO. La viabilité, l'adhésion cellulaire ainsi que le maintien des fonctions hépatosécifiques sont supérieurs avec notre technique de cryoconservation qu'avec la technique classique au DMSO. Par ailleurs, les extraits de blé (brut ou partiellement purifiés) sont naturels et non

toxiques pour les cellules. L'utilisation de l'extrait brut ou partiellement purifié comme agent de cryoconservation est fonction de l'utilisation à laquelle sont destinées les cellules. Il est certain que l'extrait partiellement purifié est plus coûteux mais il est préférable de l'utiliser dans les cas où les cellules à cryoconserver sont d'une grande valeur.

## **CHAPITRE IX**

### **LES EFFETS DE LA CRYOCONSERVATION SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450 CHEZ LES HÉPATOCYTES**

Les CYPs permettent de métaboliser les xénobiotiques qui sont les molécules de faible masse moléculaire étrangères à l'organisme, comme des médicaments, les composants de la fumée de cigarette, des polluants atmosphériques ou des composés d'origine alimentaire (Beaune, 2001). Les métabolites produits sont généralement moins toxiques que les produits initiaux, mais dans certains cas, les métabolites produits sont toxiques. Ce sont les erreurs d'un système très efficace pour transformer les xénobiotiques en métabolites non réactifs faciles à éliminer. Ainsi un xénobiotique peut être transformé en métabolites non toxiques ou toxiques, voir cancérogènes. L'équilibre entre ces voies dépend de la nature et de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et en particulier des cytochromes P450. L'expression peut varier en fonction de facteurs génétiques, environnementaux ou physiopathologiques (Beaune, 2001). L'étude des métabolites résultant du métabolisme des xénobiotiques doit donc être effectuée pour prévoir leur toxicité ou leur potentiel carcinogène.

Le métabolisme des médicaments permet leur élimination qui est le facteur le plus fréquemment responsable des différences interindividuelles en pharmacocinétique des médicaments. L'expression des enzymes métabolisant les médicaments montre des différences significatives inter-espèces, et une variabilité parmi les individus (enzymes polymorphes ou inductibles) rendant ainsi difficile de prévoir de manière précise le métabolisme d'un nouveau composé chez l'homme. Plusieurs questions clés doivent être adressées dans les premières étapes du développement des médicaments afin d'améliorer le choix des candidats: a) comment le composé sera métabolisé (vitesse d'élimination); b) quels métabolites seront produits (profil métabolique); c) quelles enzymes sont impliquées et dans quelle mesure; et d) quelles interactions directes (interactions médicamenteuses) ou indirectes (induction enzymatique) par le composé administré seront observées sur le métabolisme des médicaments (Gomez-Lechon *et al.*, 2003).

Les études du métabolisme de médicaments sont habituellement réalisées chez les animaux de laboratoire, mais elles ne sont pas suffisamment précises pour prévoir les profils métaboliques des médicaments chez l'homme. Plusieurs de ces questions peuvent maintenant être abordées par l'utilisation de modèles humains appropriés, qui accélèrent le choix de nouveaux médicaments candidats. Les hépatocytes humains sont le modèle *in vitro* le plus similaire au foie humain, et ils sont le seul modèle qui permet de produire le profil métabolique d'un médicament similaire à ce qui est trouvé *in vivo* (Gomez-Lechon *et al.*, 2003).

L'utilisation des hépatocytes humains dans les systèmes de criblage à haut débit est restreinte, car leur disponibilité est limitée. L'industrie pharmaceutique a fait des efforts considérables afin de développer des modèles *in vitro* rapides et fiables pour surmonter ces inconvénients. Les études comparatives sur des microsomes et des cellules hépatocytaires ont démontré des différences dans les profils métaboliques des médicaments qui valorisent le choix des espèces animales utilisées pour les études pharmacocinétiques et toxicologiques (Gomez-Lechon *et al.*, 2003). Les essais fiables des médicaments candidats fut et continuera d'être un défi pour les toxicologues de l'industrie pharmaceutique (Mueller *et al.*, 2007). Il est donc important de résoudre le problème de disponibilité des hépatocytes humains et d'autres espèces. La cryoconservation efficace permettant d'obtenir le maximum de cellules viables et fonctionnelles est donc primordiale. Ceci permettrait d'effectuer les tests de métabolisme des xénobiotiques sur des cellules de plusieurs espèces, y compris humaine, afin de permettre d'identification des différences inter-espèces et de trouver le système le plus reproductible pour les études de métabolisme.

L'étude des isoformes du cytochrome P450 est fondamentale pour la pharmacologie. Les interactions médicamenteuses liées aux isoformes du cytochrome P450 sont très importantes pour les études cliniques. Plusieurs consensus thérapeutiques utilisent divers médicaments dans un régime thérapeutique (polypharmacie). Cette

situation est accentuée par l'apparition de nombreuses classes pharmacologiques permettant l'élaboration de diverses combinaisons médicamenteuses. Bien qu'elles soient justifiées au niveau de l'efficacité, les associations médicamenteuses peuvent toutefois prédisposer à des interactions médicamenteuses (Beaune, 2001). L'implication des isoformes du CYP doit être élucidée. Il est important de déterminer par quel isoforme du CYP est métabolisé un xénobiotique, ainsi que l'influence sur les autres CYP, afin de prédire les interactions médicamenteuses potentielles.

Les études des CYPs requièrent des inducteurs. Ces inducteurs permettent (1) l'augmentation du métabolisme de certains médicaments, donc un effet thérapeutique diminué des autres médicaments, (2) l'activation des pro-médicaments, causant un changement dans leur efficacité et leur pharmacocinétique, ou (3) l'augmentation de la bioactivation des médicaments qui contribuent à leur hépatotoxicité par l'intermédiaire d'intermédiaires réactifs (Hewitt *et al.*, 2007).

Toutes ces études peuvent être réalisées *in vitro*, d'où l'importance pour l'industrie pharmaceutique de développer des techniques de cryoconservation efficaces afin de combler leurs besoins en cellules. Il est également important d'évaluer le maintien de l'expression des différents CYPs après cryoconservation, comparativement au niveau dans les cellules fraîches.

Les niveaux d'activité de chaque isoforme du CYP juste après le dégel selon la technique de cryoconservation sont intéressants afin de déterminer le protocole le plus approprié de cryoconservation. Les activités basales pour 4 des isoformes du CYP ont donc été mesurées après le dégel dans les suspensions cellulaires d'hépatocytes cryoconservés. Les activités basales des CYP 3A1/2, 2D2 et 2C6 dans les cellules cryoconservées avec le WPE étaient très semblables à celles obtenues avec les hépatocytes fraîchement isolés. L'activité basale du CYP 1A1/2 est plus élevée d'environ 20 % comparativement à celle des cellules fraîches.

Comparativement aux hépatocytes frais, les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO, démontrent une diminution des activités basales de 80-60 % et 70-40 % pour les isoformes 2D2 et 3A1/2 respectivement, ainsi qu'une augmentation des activités basales de 20-40 % et 20-25 % pour les isoformes 1A1/2 et 2C6 respectivement (Grondin *et al.*, 2008-b). Le DMSO pourrait donc être impliqué dans l'inhibition des isoformes 2D2 et 3A1/2 et l'induction du 2C6, alors que la cryoconservation pourrait être impliquée dans l'induction de l'isoforme 1A1/2. La cryoconservation des hépatocytes avec le WPE offre un avantage certain comparé au DMSO, puisque les niveaux de base de l'activité des 4 isoformes du cytochrome P450 suite au dégel démontrent des niveaux semblables aux hépatocytes frais. Néanmoins, les suspensions cellulaires cryoconservées avec les AcWPE, SulWPE ou duos de protéines recombinantes ont des niveaux de CYPs similaires aux cellules fraîches, aucune différence significative dans les niveaux d'activité n'est remarquée (Grondin *et al.*, 2008-c). Conséquemment, la cryoconservation avec les AcWPE, SulWPE ou duos de protéines est préférable puisque la fonction des CYPs est maintenue au même niveau que dans les cellules fraîches.

Par la suite, nous avons étudié l'activité des CYPs dans des cultures cellulaires d'hépatocytes. Des inducteurs spécifiques pour chaque isoforme étudié ont été utilisés afin de déterminer le maintien de CYPs selon la technique de cryoconservation utilisée. Certains isoformes sont inhibés par la cryoconservation conventionnelle au DMSO (CYP 3A1/2, 2D2 et 2C6) et d'autres sont activés (CYP 1A1/2). Cependant, la cryoconservation avec les AcWPE, SulWPE ou duos de protéines recombinantes permet le maintien des niveaux des CYPs similaire à celui des cellules fraîches.

Ainsi comme pour les suspensions cellulaires cryoconservées avec le WPE, les cultures de cellules cryoconservées avec le WPE démontrent des niveaux d'induction semblables aux cellules fraîches pour les isoformes 3A1/2, 2C6 et 2D2, alors que les niveaux de CYP1A1/2 sont toujours induits dans les cultures. Les cultures de cellules



cryoconservées avec le DMSO démontrent des niveaux plus faibles pour le CYP3A1/2, une inhibition du CYP2D2 et une activation du CYP1A1/2, tel qu'observé pour les suspensions cellulaires. Les niveaux d'induction du CYP2C6 diffèrent significativement pour les cellules en culture ou en suspension, puisqu'ils sont inhibés ou activés respectivement. Dans les cellules en culture, la cryoconservation au DMSO inhibe donc les isoformes CYP 2D2, 2C6 et 3A1/2 et induit les isoformes CYP 1A1/2. La cryoconservation avec le WPE offre donc une alternative attrayante, puisqu'en culture les cellules cryoconservées avec le WPE ont des niveaux d'activité du cytochrome P450 plus semblables aux hépatocytes frais (Grondin *et al.*, 2008-b). Les cultures de cellules cryoconservées avec les AcWPE, SulWPE ou duos de protéines ont des niveaux d'induction de CYPs similaires aux cellules fraîches, aucune différence significative dans les niveaux d'induction n'est remarquée (Grondin *et al.*, 2008-c). La cryoconservation avec les AcWPE, SulWPE ou duos de protéines recombinantes est donc préférable puisque la fonction des CYPs, en suspension ou en culture, est maintenue au même niveau que dans les cellules fraîches.

Un aspect intéressant est de regarder les niveaux de bases, avant induction de chaque isoforme, dépendamment de la technique de cryoconservation utilisée. Même si l'induction est semblable, il arrive que les niveaux de base soient très différents, démontrant ainsi la sensibilité de l'isoforme à la cryoconservation.

Les activités basales des 4 isoformes de CYP sont nettement augmentées lorsque les cellules cryoconservées avec les WPE ou DMSO et les hépatocytes frais sont cultivés sur des Pétris traités préalablement avec du Matrigel. Les activités basales des cultures sur Matrigel montrent que, les activités des 4 isoformes de CYPs sont semblables pour les cellules fraîches et les cellules cryoconservées avec WPE, alors qu'elles sont inférieures pour les cellules cryoconservées avec le DMSO, à l'exception du CYP2C6. L'activité des isoformes du CYP est dépendante des

conditions de culture puisque l'activité du CYP2D2 est faiblement induite lorsque les cellules cryoconservées avec le DMSO sont cultivées sur une surface non-traitée, alors qu'elle est rétablie au même niveau que les cellules fraîches lorsque cultivées sur Matrigel. Cette expérience n'a cependant pas été effectuée pour les cellules cryoconservées avec les AcWPE, SulWPE ou les duos de protéines.

Des études précédentes ont indiquées que les activités des isoformes du CYP tels que le CYP1A et 3A, après induction, étaient inférieures pour les cellules cryoconservées avec le DMSO en comparaison avec les activités des cellules fraîches (voir la revue : Li *et al.*, 1999). Cependant, des rapports plus récents ont montré que les activités enzymatiques de CYP3A, 2C et 2D, après induction, sont maintenues dans les hépatocytes de rat cryoconservés avec le DMSO, relativement aux hépatocytes frais (Hewitt et Utesch, 2004; Houle *et al.*, 2003). L'activité de CYP2C6 (activité d'hydroxylase de tolbutamide) dans les suspensions de cellules cryoconservées avec le DMSO est inférieure à celle des cellules fraîches (Hewitt et Utesch, 2004). Nos résultats démontrent que l'induction de l'activité des CYPs pour les cellules cryoconservées avec le DMSO est équivalente ou légèrement inférieure à celle mesurée pour les cellules fraîches et les cellules cryoconservées avec WPE, AcWPE, SulWPE ou duos de protéines recombinantes.

Les hépatocytes en suspension et en culture monocouche sont couramment utilisés pour les études sur les nouveaux médicaments. En raison de la durée de vie limitée des hépatocytes (approximativement 5 h), les suspensions d'hépatocytes ne peuvent être utilisées que pour certaines applications, telles que la stabilité métabolique hépatique, l'inhibition du CYP450 et les activités des transporteurs de médicaments (Li, 2007). Cependant, les études d'induction des CYPs exigent l'utilisation de cultures en monocouche qui peuvent être en culture pendant 3 à 4 jours. Ces études demeurent le standard exigé par la FDA pour détecter les interactions médicamenteuses d'un nouveau médicament

Les activités des CYP450 induites pour les cellules cryoconservées avec les WPE, AcWPE, SulWPE ou duos de protéines recombinantes sont plus semblables à celles observées dans les hépatocytes frais. Ceci suggère que les WPE, AcWPE, SulWPE ou duos de protéines sont des cryoprotecteurs plus appropriés pour les cultures primaires d'hépatocytes que le DMSO. Cette étude démontre d'une manière concluante que les hépatocytes de rat cryoconservés avec les WPE, AcWPE, SulWPE ou duos de protéines maintiennent leur compétence métabolique et leur capacité de répondre aux inducteurs classiques des CYP après le dégel.

La cryoconservation avec les WPE, SulWPE, AcWPE et duos de protéines recombinantes pourrait être un outil avantageux pour la découverte de nouveaux médicaments puisque les hépatocytes cryoconservés maintiennent leur activité pour les 4 isoformes de CYP étudiés que ce soit en suspension ou en culture. Cette technologie est fortement appropriée pour la recherche et découverte de médicaments et est actuellement validée pour les hépatocytes humains. Le développement et l'optimisation du protocole de cryoconservation pour les hépatocytes humains fourniront une solution pour la disponibilité des hépatocytes pour la transplantation de patients souffrant de déficiences hépatiques aiguës et de défauts métaboliques du foie (Terry *et al.*, 2006a).

## **CHAPITRE X**

### **LES EFFETS DE LA CRYOCONSERVATION SUR LES MOLÉCULES D'ADHÉSION DES HÉPATOCYTES**

La viabilité cellulaire et le maintien des fonctions hépatospécifiques sont deux facteurs primordiaux dans l'évaluation d'une technique de cryoconservation. Cependant, l'adhésion cellulaire est essentielle pour le maintien de la viabilité des cellules en culture ainsi que pour les fonctions hépatospécifiques.

L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (EMC) joue un rôle central dans beaucoup de processus biologiques complexes, y compris la forme, la motilité, la croissance, la différenciation et la survie cellulaire (Aplin *et al.*, 1998; Danen et Yamada, 2001), en particulier, dans le cas des cellules épithéliales qui sont fixées aux membranes basales. Ces cellules possèdent une variété de glycoprotéines adhésives de l'EMC, telles que le collagène, la laminine, la fibronectine et les protéoglycans. L'attachement des cellules est crucial pour l'architecture cellulaire tridimensionnelle, pour l'établissement de la polarité basale-apicale et pour maintenir l'intégrité tissulaire (Ashkenas *et al.*, 1996; Gumbiner, 1996). Les contacts cellules-cellules sont également essentiels à plusieurs fonctions cellulaires, telles que la différenciation, l'homéostasie et la réparation de dommages cellulaires. Ces processus importants sont en partie contrôlés par un certain nombre de molécules d'adhésion qui montrent un modèle spatio-temporel d'expression bien régulé pendant le développement et la régénération (Hynes, 1992).

La cryoconservation modifie la capacité d'adhésion des cellules (Hamel *et al.*, 2006). Dans le 3<sup>e</sup> article, l'observation morphologique 24 h après l'ensemencement montre l'adhésion des hépatocytes décongelés, qui étaient cryoconservés avec les WPE, DMSO, SulWPE, AcWPE ou des protéines de recombinantes, comparativement aux hépatocytes fraîchement isolés (Grondin *et al.*, 2008-a). L'adhésion des cellules fraîches est plus élevée et l'étalement des hépatocytes frais est plus étendu que pour les cellules cryoconservées, rendant l'identification d'une cellule fraîche individuelle plus difficile. Les cellules cryoconservées avec les WPE, SulWPE, AcWPE ou des protéines recombinantes sont plus étalées comparativement aux cellules

cryoconservées avec le DMSO, mais se présentent moins étalées (plus rondes) comparativement aux cellules fraîches (Grondin *et al.*, 2008-a; Hamel *et al.*, 2006).

Dans le 1<sup>er</sup> article, nous avons démontré que les efficacités d'attachement sont de l'ordre de 50 % pour les cellules cryoconservées avec le WPE et le DMSO comparativement aux cellules fraîches (Hamel *et al.*, 2006). Nos résultats sont semblables à ceux obtenus dans d'autres études sur des hépatocytes cryoconservés au DMSO (Chesne *et al.*, 1993; Coundouris *et al.*, 1993; Coundouris *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005; Swales *et al.*, 1996-b; Swales *et al.*, 1996). L'adhésion des cellules est très importante puisque la densité cellulaire a un impact sur les activités métaboliques et l'intégrité fonctionnelle des cellules. Bien que plusieurs chercheurs aient essayé de reconstituer ces activités dans des cultures d'hépatocytes matures en monocouche, la plupart des tentatives ont échouées probablement en raison de la perte de la configuration polarisée des hépatocytes (Berthiaume *et al.*, 1996). L'architecture des hépatocytes en culture joue un rôle crucial dans le maintien de l'expression des gènes hépatiques (Berthiaume *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 1992b; Musat *et al.*, 1993; Rana *et al.*, 1994). Nous avons également démontré que l'efficacité d'attachement est supérieure pour les cellules cryoconservées avec SulWPE, AcWPE ou des protéines recombinantes, comparativement aux cellules cryoconservées avec le DMSO ou le WPE (Grondin *et al.*, 2008-a, 2008-c). L'efficacité d'attachement est de l'ordre de 70 % pour les cellules cryoconservées avec les SulWPE, AcWPE ou les protéines recombinantes.

Les mécanismes responsables de cette diminution de l'efficacité d'attachement ne sont toutefois pas connus. Afin d'élucider ces mécanismes, nous avons étudié l'effet de la cryoconservation sur la stabilité de trois des plus importantes molécules d'adhésion, soit l'intégrine  $\beta 1$ , la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine, en utilisant l'immunofluorescence et l'immunobuvardage.

Les intégrines représentent la plus importante famille de molécules d'adhésion de l'ECM. Ce sont des protéines hétérodimériques transmembranaires, composées de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles possèdent des domaines extracellulaires de liaison à l'ECM, et des domaines cytoplasmiques qui s'associent au cytosquelette d'actine et à d'autres protéines, y compris la vinculine, la taline, la paxilline et l' $\alpha$ -actinine (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Elles interviennent généralement dans l'interaction cellule-matrice (Knudsen *et al.*, 1998; Vleminckx et Kemler, 1999).

Plusieurs autres molécules d'adhésion ont été identifiées et classifiées dans plusieurs familles (Gumbiner, 1996; Shimizu, 1996), dont la famille des cadhérines (molécules d'adhésion calcium-dépendante). Elles interviennent généralement dans les interactions cellules-cellules et jouent un rôle fondamental en maintenant l'intégrité des structures multicellulaires (Wu et Maniatis, 1999). La E-cadhérine était nommée à l'origine uvomoruline ou L-CAM (molécule d'adhésion des cellules du foie), suggérant de ce fait que ce soit un régulateur important d'adhésion intercellulaire des hépatocytes (Gallin *et al.*, 1985; Ringwald *et al.*, 1987).

Une autre superfamille de molécule d'adhésion est la famille des caténines. L' $\alpha$ -caténine se lie au domaine cytoplasmique des cadhérines par l'intermédiaire de  $\beta$ - ou  $\gamma$ -caténine; l' $\alpha$ -caténine ne se lie pas directement aux cadhérines (Nathke *et al.*, 1994). En raison de son homologie avec la vinculine, on suggère que l' $\alpha$ -caténine lie le complexe cadhérine/caténine au cytosquelette (Tsukita *et al.*, 1992). La  $\beta$ -caténine est un membre important de cette famille, elle est responsable de la transactivation des gènes cibles après la formation du complexe hétérodimérique entre le facteur des cellules T et la famille des facteurs lymphoïdes puis de sa translocation au noyau (Hsu *et al.*, 1998; Zhurinsky *et al.*, 2000b). Certaines études ont démontré que les niveaux de  $\beta$ -caténine sont étroitement régulés par la disponibilité de la forme monomérique libre à l'intérieur d'une cellule normale, ainsi que pendant la croissance (Monga *et al.*, 2001; Peifer et Polakis, 2000; Salic *et al.*, 2000). La  $\beta$ -caténine est

localisée à la membrane des hépatocytes dans un foie normal de rat adulte avec une faible présence cytoplasmique (Monga *et al.*, 2001). L'association de la E-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine à la membrane cellulaire est bien connue. Cette association joue un rôle dans l'adhésion cellules-cellules.

Les cultures primaires d'hépatocytes sont couramment utilisées comme système modèle pour étudier les fonctions du foie, dont le métabolisme des médicaments, l'hépatotoxicité, la biosynthèse de protéines et l'expression de gènes. En culture dans des Pétris en plastique, les hépatocytes matures isolés s'étalent rapidement, et montrent des fonctions hépatospécifiques nettement réduites (Bissell *et al.*, 1987). En culture sur des Pétris en plastique enduits de protéoglycans dérivés du foie (Koide *et al.*, 1989; Tong *et al.*, 1992) ou d'un substrat synthétique (Tobe *et al.*, 1992), les hépatocytes s'agrègent en sphéroïdes multicellulaires, tout en maintenant leur polarité cellulaire normale et certaines fonctions différenciées pendant des périodes prolongées.

Les jonctions serrées (TJs) et les jonctions adhérentes (AJs) forment une barrière à la diffusion des macromolécules à travers l'épithélium dans différents tissus. Les TJs sont une barrière physique à la diffusion des macromolécules dans l'espace extracellulaire, et les AJs peuvent indirectement réguler la structure et la fonction des TJs (Rao *et al.*, 2002). Les occludines (Anderson et Van Itallie, 1995), claudines (Tsukita et Furuse, 1999) et molécules des AJs (Martin-Padura *et al.*, 1998) sont les protéines transmembranaires localisées aux TJs. Les E-cadhérines et les caténines sont principalement localisées aux AJs (Anderson et Van Itallie, 1995). La liaison des  $\beta$ -caténines et des E-cadhérines joue donc un rôle important dans le maintien de la structure des AJs (Cowin et Burke, 1996).



Nous avons utilisé l'immunofluorescence afin de localiser les intégrines  $\beta 1$ , les E-cadhérines et les  $\beta$ -caténines dans les hépatocytes. La fluorescence de ces molécules est plus élevée dans les cellules fraîches comparativement aux cellules cryoconservées avec le WPE ou le DMSO. Aucune différence significative des niveaux de fluorescence entre les cellules cryoconservées avec le DMSO ou le WPE n'a été notée. La localisation des molécules d'adhésion est identique pour les cellules cryoconservées et pour les cellules fraîches (Grondin *et al.*, 2008-a).

L'analyse par immunobuvardage confirme les observations obtenues par immunofluorescence. Le niveau des protéines, correspondant aux trois marqueurs utilisés (intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine et  $\beta$ -caténine), est beaucoup plus élevé dans les cellules fraîches comparées aux cellules cryoconservées. Ces résultats démontrent également que le WPE permettent de conserver de plus hauts niveaux de protéines d'adhésion comparativement au DMSO (Grondin *et al.*, 2008-a).

Nous avons démontré que la quantité d'intégrine  $\beta 1$  est diminuée de 62 et 74 % respectivement pour les cellules cryoconservées avec le WPE et le DMSO (Grondin *et al.*, 2008-a). Giacotti a démontré qu'une perte d'intégrine  $\beta 1$  cause une perte d'activité fonctionnelle des jonctions d'adhésion (Giacotti, 1997). Nous avons également observé une diminution de l'intégrine  $\beta 1$  chez les cellules cryoconservées avec le WPE ou le DMSO pouvant causer une perte de fonction des jonctions d'adhésion, d'où une perte d'adhésion des cellules cryoconservées.

La quantité de la E-cadhérine est diminuée de 21 et 37 % respectivement pour les cellules cryoconservées avec le WPE et le DMSO (Grondin *et al.*, 2008-a). Par immunohistochimie, il a été démontré que la  $\beta$ -caténine est localisée préférentiellement à la membrane des hépatocytes dans le foie de rat adulte (Monga *et al.*, 2001). De plus, la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine sont situées dans les jonctions d'adhésion entre les cellules (Higashi *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2007). Nous avons noté

une légère diminution de la E-cadhérine ainsi qu'une diminution plus importante de 58 et 51 % de la  $\beta$ -caténine pour les cellules cryoconservées avec le WPE et le DMSO respectivement, et qu'elle est localisée à la membrane chez les cellules fraîches et les cellules cryoconservées (Grondin *et al.*, 2008-a). Nous avons également démontré que dans les cellules fraîches, la localisation de la E-cadhérine est à la membrane entre les cellules (Grondin *et al.*, 2008-a). La perte de la E-cadhérine peut causer la déstabilisation de l'intégrité structurale de l'épithélium et dissocier les cellules de leurs voisins (Gumbiner, 1996). Une diminution sur cette molécule d'adhésion peut donc ainsi expliquer une perte de contact cellules-cellules. La diminution plus importante de la  $\beta$ -caténine qui se lie à la région extramembranaire de la E-cadhérine peut également expliquer cette perte de contact cellules-cellules.

De plus, l'analyse de l'immunobuvardage pour les cellules cryoconservées avec les SulWPE, AcWPE ou protéines recombinantes démontre une perte plus faible de 15 à 20 % des molécules d'adhésion comparativement aux hépatocytes cryoconservés avec le WPE ou le DMSO. Ces résultats démontrent que les WPEs partiellement purifiés et les protéines recombinantes sont plus efficaces pour cryoconserver les hépatocytes comparativement au DMSO.

La grande capacité des protéines recombinantes à protéger les molécules d'adhésion peut être liée à leur fonction native chez le blé. Dans le 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> article, nous avons démontré le potentiel cryoprotecteur de 5 protéines recombinantes (WCS120, *Ta*IRI-2, WCS19, *Ta*TIL, et WCOR410) (Grondin *et al.*, 2008-a, 2008-c). Deux combinaisons de protéines recombinantes ont été étudiées dans le 3<sup>e</sup> article (WCS120-*Ta*IRI-2 et WCS19-*Ta*TIL), bien que la combinaison *Ta*TIL-WCOR410 donne également une bonne viabilité après dégel (Grondin *et al.*, 2008-c).

Chez le blé, la déhydrine WCS120 se retrouve dans le cytoplasme et le nucléoplasme suggérant un rôle de protection général. Sa présence élevée dans le noyau indique également un potentiel pour la protection de la machinerie transcriptionnelle. La WCS120 est hydrophile ce qui implique que cette protéine pourrait fournir un microenvironnement réduisant la perte de molécules d'eau et la dénaturation des protéines (Jaenicke, 1991) durant la déshydratation. La WCS120 pourrait entourer les protéines cellulaires essentielles et les protéger contre des changements de conformation ou l'agglomération pendant la congélation ou la déshydratation autant chez le blé que chez les cellules cryoconservées (Houde *et al.*, 1995). Il a été démontré que la WCS120 protège la LDH contre la dénaturation induite par la congélation 100 fois plus que le BSA (Houde *et al.*, 1995). Ainsi, WCS120 peut protéger l'intégrité des molécules d'adhésion situées à la membrane cellulaire et empêcher leur détachement de la membrane cellulaire.

L'expression génétique de *TaIRI-2* est régulée à la hausse par les basses températures. *TaIRI-2* démontre des homologies de séquence avec les protéines AFPs qui possèdent une activité d'inhibition de recristallisation de la glace, ce qui suggère fortement un rôle dans l'acclimatation au froid et la tolérance au gel chez le blé (Tremblay *et al.*, 2005). La structure primaire de *TaIRI-2* montre une série de motifs répétés hautement conservés avec des résidus sérine et thréonine régulièrement espacés qui peuvent former des ponts hydrogène avec la surface de la glace (Sidebottom *et al.*, 2000), empêchant la croissance des cristaux de glace qui endommagent les parois cellulaires lors de la cryoconservation. La capacité des protéines *TaIRI-2* à inhiber la croissance des cristaux de glace peut contribuer à la survie de la cellule et à la protection des membranes pendant la cryoconservation des hépatocytes.

*TaTIL* est une lipocaline végétale qui pourrait avoir un rôle antioxydant et être impliquée dans le transport du stérol à la membrane en réponse au stress (Demel et De Kruffy, 1976). En raison de son homologie avec les lipocalines ancrées à la

membrane tel que les Blc, ApoD et Lazarillo, il est suggéré que la protéine *TaTIL* pourrait également être une protéine associée à la membrane (Frenette Charron *et al.*, 2002). Toutes ces protéines semblent être exprimées en réponse à des stress membranaires (Bishop, 2000), suggérant un rôle biologique dans la biogenèse et la réparation des membranes dans des conditions de stress sévères. Les stress de température sont connus pour induire des dommages membranaires. Ainsi, *TaTIL* pourrait protéger la membrane cellulaire contre les dommages induits par la cryoconservation et ainsi empêcher la perte de molécules d'adhésion.

La protéine WCS19, une LEA du groupe 3, est exprimée constitutivement à 20°C et devient fonctionnelle après un changement de température. La WCS19 contient plusieurs répétitions de 11-mers. On a proposé pour les protéines contenant ces répétitions une fonction de chélateur d'ions pendant la dessiccation (Dure, 1993) ainsi qu'une certaine activité cryoprotectrice (Honjoh *et al.*, 2000). Ces protéines amphipatiques peuvent aussi stabiliser et protéger contre la dénaturation partielle des protéines ou des membranes par leurs interactions hydrophobes. La WCS19 peut aussi interagir avec des lipides et des protéines spécifiques de la membrane et du stroma (N'Dong *et al.*, 2002). Toutes ces fonctions de la WCS19 peuvent permettre une protection de la membrane cellulaire et des molécules d'adhésion.

La WCOR410 est une déhydrine acide dont les propriétés, l'abondance et la localisation suggèrent une implication dans la cryoprotection de la membrane plasmique lors de la congélation. Les protéines telles que la WCOR410 contiennent une teneur élevée en acides aminés acides, basiques et hydroxylés qui peuvent interagir avec les lipides membranaires, tels que les différents phospholipides, les cébrosides et les stérols. Si une molécule WCOR410 peut se lier à plusieurs espèces de lipides en même temps, ceci pourrait empêcher la déstabilisation lipidique qui se produit pendant la déshydratation. Les déhydrines acides peuvent agir au niveau de la conservation de l'eau ou directement remplacer l'eau de solvation de la membrane.

La WCOR410 peut donc empêcher la déstabilisation de la membrane plasmique se produisant pendant la déshydratation liée à la congélation, et ainsi être un facteur déterminant pour la résistance accrue des cellules à la congélation (Danyluk *et al.*, 1998).

Les données du 3<sup>e</sup> article, démontrent la capacité des WPEs et des protéines recombinantes à améliorer l'efficacité d'adhésion des hépatocytes de rat, par la protection des trois principales molécules d'adhésion (intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine et  $\beta$ -caténine), qui sont importantes pour l'intégrité structurale et métabolique des hépatocytes (Grondin *et al.*, 2008-a). La détermination des mécanismes par lesquels les WPEs et les protéines recombinantes protègent ces molécules, aidera à optimiser le procédé de cryoconservation afin d'obtenir des cellules cryoconservées avec une efficacité d'adhésion comparable aux cellules fraîches.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Plusieurs études ont démontré que la cryoconservation avec la technique classique du DMSO comporte d'incontestables limitations : perte d'efficacité d'attachement et diminution des fonctions hépatospécifiques. Dans cette présente étude, nous avons mis au point de nouveaux protocoles de cryoconservation permettant de pallier à ces limitations.

La technique de cryoconservation avec le DMSO et les WPEs (NA et CA) démontre une perte de l'adhésion cellulaire (soit 50 % d'adhésion) (Hamel *et al.*, 2006). Cependant, une meilleure adhésion cellulaire (environ 70%) est obtenue avec les techniques de cryoconservation avec les SulWPE et AcWPE ou les protéines recombinantes. Bien que l'adhésion des cellules cryoconservées avec les WPEs ou les SulWPE, AcWPEs et les protéines recombinantes soit différente, leur morphologie cellulaire est similaire. L'analyse morphologique par microscopie démontre qu'après 24 h en culture, ces cellules cryoconservées demeurent plutôt rondes et ne s'étalent pas comme les cellules fraîches. Cependant, des contacts cellules-cellules sont observés tout comme pour les cultures de cellules fraîches ou cryoconservées avec les WPEs ou protéines recombinantes. De plus, les cellules cryoconservées avec les protéines partiellement purifiées ou les protéines recombinantes se regroupent plus que les cellules cryoconservées selon la technique classique au DMSO. Donc, nous avons obtenu une amélioration de l'adhésion et de la morphologie cellulaire grâce aux protocoles de cryoconservation avec les SulWPE et AcWPE ou les protéines recombinantes.

Les WPEs (bruts et partiellement purifiés) et les protéines recombinantes ont démontré leur capacité d'amélioration de l'adhésion des hépatocytes de rat, en protégeant les trois principales molécules d'adhésion (intégrine  $\beta 1$ , E-cadhérine et  $\beta$ -caténine), reconnues pour leur importance dans le maintien de l'intégrité structurale et métabolique des hépatocytes (Grondin *et al.*, 2008-a). La détermination des mécanismes par lesquels les WPEs et les protéines recombinantes protègent ces

molécules, permettra l'optimisation du procédé de cryoconservation afin d'obtenir des cellules cryoconservées avec une adhésion comparable aux cellules fraîches. Les mécanismes proposés dans le processus de cryoconservation sont basés sur les rôles et fonctions des protéines de tolérance au gel chez le blé.

Nous pouvons donc associer la fonction des protéines natives chez le blé à un rôle potentiel dans la cryoconservation de cellules animales. La WCS120 possède un pouvoir cryoprotecteur 100 fois plus élevé que le BSA (Houde *et al.*, 1995). Ainsi, elle pourrait protéger les molécules d'adhésion situées à la membrane cellulaire en empêchant leur dénaturation et leur désencrage de la membrane cellulaire. La structure primaire de *TaIRI-2* montre sa capacité à former des ponts hydrogène avec la surface des cristaux de glace (Sidebottom *et al.*, 2000). *TaIRI-2* pourrait donc empêcher la recristallisation de glace et ainsi contribuer à la survie des cellules par la protection de ses membranes et de ses composantes. Les lipocalines sont exprimées en réponse à des stress membranaires (Bishop, 2000), ce qui implique un rôle biologique dans la biogenèse et la réparation des membranes. Son homologue végétal *TaTIL*, pourrait donc protéger la membrane cellulaire de la dénaturation thermique et ainsi empêcher la perte de molécules d'adhésion. La WCS19 possède un rôle cryoprotecteur (N'Dong *et al.*, 2002) et pourrait, par ses interactions hydrophobes, stabiliser et protéger des protéines et/ou des membranes contre la dénaturation partielle. La WCS19 pourrait également interagir avec des lipides et des protéines spécifiques de la membrane et du stroma. Toutes ces fonctions de la WCS19 permettraient une protection de la membrane cellulaire et des molécules d'adhésion.

La conservation de l'adhésion des cellules est très importante, mais le maintien des fonctions hépatospécifiques est primordial pour l'évaluation d'une technique de cryoconservation. Chez les hépatocytes cryoconservés avec le DMSO, le taux de sécrétion de l'albumine est inférieur au taux des hépatocytes frais ou cryoconservés avec les WPEs (Guillouzo *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2001a; Son *et al.*, 2004; Sosef *et*



*al.*, 2005). La synthèse de l'urée est également altérée, le taux étant inférieur à celui des cellules fraîches ou cryoconservées avec les WPEs (Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005). La cryoconservation avec les WPEs permet un bon maintien des fonctions hépatos spécifiques (Silva *et al.*, 1999; Sosef *et al.*, 2005).

De plus, la cryoconservation avec les WPE, SulWPE, AcWPE et protéines recombinantes pourrait être un outil avantageux dans la découverte de nouveaux médicaments puisque les hépatocytes cryoconservés maintiennent des niveaux d'activité des 4 isoformes du CYP similaires aux cellules fraîches en suspension ou en culture. Cette technologie est très appropriée pour la recherche/découverte de nouveaux médicaments et est actuellement validée pour les hépatocytes humains.

Les extraits de blé (bruts ou partiellement purifiés) et les protéines recombinantes sont des cryoprotecteurs supérieurs au DMSO. La viabilité et l'adhésion cellulaire ainsi que le maintien des fonctions hépatos spécifiques sont supérieurs avec notre technique de cryoconservation qu'avec la technique classique au DMSO. D'autres avantages non négligeables des extraits de blé (bruts ou partiellement purifiés) sont leur composition naturelle et leur non toxicité pour les cellules. L'usage de l'extrait brut ou partiellement purifié de blé dépend de l'utilisation ultérieure des cellules. Il est certain que l'extrait partiellement purifié est plus coûteux mais son efficacité supérieure lui confère un avantage certain dans les cas où les cellules cryoconservées sont d'une grande valeur.

Le développement et l'optimisation du protocole de cryoconservation pour les hépatocytes humains fournira une solution potentielle à la disponibilité restreinte des hépatocytes pour la transplantation de patients souffrant de déficiences aiguës hépatiques ou de défauts métaboliques du foie (Terry *et al.*, 2006a). L'amélioration des techniques de cryoconservation pourrait également permettre l'établissement de nouveaux protocoles permettant une meilleure évaluation des phases I et II des

nouveaux médicaments sur les hépatocytes humains. Ces protocoles permettraient une augmentation de la fiabilité des tests.

Le protocole de cryoconservation avec les protéines de blé peut également être appliqué à plusieurs autres types cellulaires ou tissus. Il existe une demande importante pour plusieurs types cellulaires ou tissus tel que les cellules reproductrices (spermatozoïdes, ovocytes), les embryons, les cellules souches, les cornées ou les tissus de peau. Une cryoconservation efficace permettra de répondre aux demandes.

Dans le domaine de la reproduction, les cryoprotecteurs couramment utilisés sont le DMSO ou le glycérol complémenté avec des protéines animales (SFV, jaune d'œuf). Due aux contaminations virales potentielles, la tendance est à l'élimination de l'utilisation des protéines animales en cryoconservation. La technique de cryoconservation développée ici ne contient aucune protéine animale et ne requiert pas de complémentation avec des protéines animales. De plus, tout comme pour les hépatocytes, les techniques de cryoconservation présentement utilisées en reproduction animale et humaine présentent des lacunes. L'utilisation des protéines de blé comme agent de cryoconservation a le potentiel d'améliorer la condition des cellules reproductrices et des embryons après dégel.

Des études additionnelles, sur la mécanistique de protection des protéines de blé, seraient intéressantes. Ces recherches permettraient peut-être de découvrir de nouvelles classes de protéines impliquées dans la cryoconservation. De plus, une étude approfondie de la composition de l'extrait permettrait l'identification de nouvelles protéines impliquées dans le potentiel cryoconservateur de l'extrait de blé.

## RÉFÉRENCES

Akerstrom, B., Flower, D. R. et Salier, J. P. 2000. «Lipocalins: unity in diversity». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1482, no 1-2, p. 1-8.

Andersen, B., Zierz, S. et Jungermann, K. 1983. «Perinatal development of the distributions of phosphoenolpyruvate carboxykinase and succinate dehydrogenase in rat liver parenchyma». *Eur J Cell Biol*. vol. 30, no 1, p. 126-131.

Anderson, J. M. et Van Itallie, C. M. 1995. «Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability». *Am J Physiol*. vol. 269, no 4 Pt 1, p. G467-475.

Antikainen, M. et Pihakaski, S. 1994. «Early developments in RNA, protein, and sugar levels during cold stress in winter rye [*Secale cereale*] leaves.». *Ann Bot*. vol. 74, p. 335-341.

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. et Juliano, R. L. 1998. «Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.». *Pharmacol Rev*. vol. 50, p. 197-252.

Apte, U., Zeng, G., Thompson, M. D., Muller, P., Micsenyi, A., Cieply, B., Kaestner, K. H. et Monga, S. P. 2007. «beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. vol. 292, no 6, p. G1578-1585.

Ashkenas J., Muschler J. et Bissell MJ. 1996. «The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla.». *Dev Biol*. vol. 15, p. 433-444.

Bachmann, K. A. et Ghosh, R. 2001. «The use of in vitro methods to predict in vivo pharmacokinetics and drug interactions». *Curr Drug Metab*. vol. 2, no 3, p. 299-314.

Bachmann, M., Matile, P. et Keller, F. 1994. «Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. (Cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme)». *Plant Physiol*. vol. 105, no 4, p. 1335-1345.

Bartels, D. et Nelson, D. 1994. «Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics.». *Plant Cell Environ.* vol. 17, p. 659–667.

Baust, J. M., Van, B. et Baust, J. G. 2000. «Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis». *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* vol. 36, no 4, p. 262-270.

Baust, J. M., Vogel, M. J., Van Buskirk, R. et Baust, J. G. 2001. «A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival». *Cell Transplant.* vol. 10, no 7, p. 561-571.

Beaune, P. 1993. «Human cytochromes P450. Applications in pharmacology». *Therapie.* vol. 48, no 6, p. 521-526.

Beaune, P. 2001. «[Diet, genetics and cancer]». *Gastroenterol Clin Biol.* vol. 25, no 4 Suppl, p. B20-25.

Belinsky, S. A., Badr, M. Z., Kauffman, F. C. et Thurman, R. G. 1986. «Mechanism of hepatotoxicity in periportal regions of the liver lobule due to allyl alcohol: studies on thiols and energy status». *J Pharmacol Exp Ther.* vol. 238, no 3, p. 1132-1137.

Benet, L. Z., Mitchell, J. R. et Sheiner, L. B. 1990 *Pharmacokinetic : the kinetics of drug absorption distribution and elimination*, Goodman Gilman A.. eds, 8e edition, Toronto

Bennett, A. L., Paulson, K. E., Miller, R. E. et Darnell, J. E., Jr. 1987. «Acquisition of antigens characteristic of adult pericentral hepatocytes by differentiating fetal hepatoblasts in vitro». *J Cell Biol.* vol. 105, no 3, p. 1073-1085.

Berry, M. N. et Friend, D. S. 1969. «High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study». *J Cell Biol.* vol. 43, no 3, p. 506-520.

Berthiaume, F., Moghe, P. V., Toner, M. et Yarmush, M. L. 1996. «Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: Hepatocytes cultured in a sandwich configuration.». *FASEB J.* vol. 10, p. 1471-1484.

Bertrand, A. et Paquin, R. 1991. «Influence de la température d'endurcissement sur la tolérance au gel de la luzerne et sa teneur en sucres, amidon et proline.». *Can J Plant Sci.* vol. 71, p. 737–747.

- Billings, R. E., McMahon, R. E., Ashmore, J. et Wagle, S. R. 1977. «The metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. A comparison with in vivo drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions». *Drug Metab Dispos.* vol. 5, no 6, p. 518-526.
- Bishop, R. E. 2000. «The bacterial lipocalins». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1482, no 1-2, p. 73-83.
- Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J. et Roll, F. J. 1987. «Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver». *J Clin Invest.* vol. 79, no 3, p. 801-812.
- Blaauboer, B. J., van Holsteijn, I., van Graft, M. et Paine, A. J. 1985. «The concentration of cytochrome P-450 in human hepatocyte culture». *Biochem Pharmacol.* vol. 34, no 13, p. 2405-2408.
- Blankson, E. A., Chenery, R. J. et Paine, A. J. 1991. «Cytochrome P450 maintenance and diazepam metabolism in cultured rat hepatocytes». *Biochem Pharmacol.* vol. 42, no 6, p. 1241-1245.
- Botto, F., Seree, E., el Khyari, S., de Sousa, G., Massacrier, A., Placidi, M., Cau, P., Pellet, W., Rahmani, R. et Barra, Y. 1994. «Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene». *Biochem Pharmacol.* vol. 48, no 6, p. 1095-1103.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. et Martin-Tanguy, J. 1999. «Polyamines and environmental challenges: recent development.». *Plant Sc.* vol. 140, p. 103-125.
- Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F. et Sarhan, F. 2000. «Biotechnological applications of plant freezing associated proteins». *Biotechnol Annu Rev.* vol. 6, p. 59-101.
- Bustamante, J., Lodge, J. K., Marcocci, L., Tritschler, H. J., Packer, L. et Rihn, B. H. 1998. «Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease». *Free Radic Biol Med.* vol. 24, no 6, p. 1023-1039.
- Cadieux, C., Sarhan, F. et Perras, M. 1988. «Osmotic adjustment and photosynthetic electron transport response to cold hardening in winter and spring wheat.». *Plant Physiology and Biochemistry.* vol. 26, p. 313-322.

Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P. L., Hatzfeld, M., Kedersha, N. et Paolo Dotto, G. 1998. «Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion». *J Cell Biol.* vol. 141, no 6, p. 1449-1465.

Campra, J. et Reynolds, R. 1989 *The Hepatic Circulation*, Raven, New York

Charron, J. B., Ouellet, F., Pelletier, M., Danyluk, J., Chauve, C. et Sarhan, F. 2005. «Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins». *Plant Physiol.* vol. 139, no 4, p. 2017-2028.

Chen, T. H. H. et Li, P. (1982) Potato cold acclimation. In: Li, P. H. e. S., A., eds. (ed). *Plant cold hardiness and freezing stress: Mechanisms and Crop Implications*, Academic Press Ed., New-York, USA

Chesne, C. et Guillouzo, A. 1988. «Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions». *Cryobiology.* vol. 25, no 4, p. 323-330.

Chesne, C., Guyomard, C., Fautrel, A., Poullain, M. G., Fremond, B., De Jong, H. et Guillouzo, A. 1993. «Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation». *Hepatology.* vol. 18, no 2, p. 406-414.

Chianale, J., Dvorak, C., May, M. et Gumucio, J. J. 1986. «Heterogeneous expression of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 genes within the hepatic acinus in the rat». *Hepatology.* vol. 6, no 5, p. 945-951.

Clément, B. et Guillouzo, A. 1992 *Cellular and molecular aspects of cirrhosis.*, INSERM Ed Ed., Paris, France

Coundouris, J. A., Grant, M. H., Engeset, J., Petrie, J. C. et Hawksworth, G. M. 1993. «Cryopreservation of human adult hepatocytes for use in drug metabolism and toxicity studies». *Xenobiotica.* vol. 23, no 12, p. 1399-1409.

Coundouris, J. A., Grant, M. H., Simpson, J. G. et Hawksworth, G. M. 1990. «Drug metabolism and viability studies in cryopreserved rat hepatocytes». *Cryobiology.* vol. 27, no 3, p. 288-300.

Courtens, J. L., Ekwall, H., Paquignon, M. et Ploen, L. 1989a. «Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing». *J Reprod Fertil.* vol. 87, no 2, p. 613-626.

- Courtens, J. L., Ekwall, H. et Ploen, L. 1992. «Comparison of nuclear hydration in boar spermatozoa before and after freeze-thawing: contrast analysis of cells embedded in bromide-labeled medium». *Microsc Res Tech.* vol. 21, no 3, p. 249-254.
- Courtens, J. L., Paquignon, M., Blaise, F., Ekwall, H. et Ploen, L. 1989b. «Nucleus of the boar spermatozoon: structure and modifications in frozen, frozen-thawed, or sodium dodecyl sulfate-treated cells». *Mol Reprod Dev.* vol. 1, no 4, p. 264-277.
- Cowin, P. et Burke, B. 1996. «Cytoskeleton-membrane interactions». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 8, no 1, p. 56-65.
- Crevel, R. W., Fedyk, J. K. et Spurgeon, M. J. 2002. «Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure». *Food Chem Toxicol.* vol. 40, no 7, p. 899-903.
- Danen, E. H. et Yamada, K. M. 2001. «Fibronectin, integrins, and growth control». *J Cell Physiol.* vol. 189, no 1, p. 1-13.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. et Sarhan, F. 1998. «Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat». *Plant Cell.* vol. 10, no 4, p. 623-638.
- Davies, P. L. et Hew, C. L. 1990. «Biochemistry of fish antifreeze proteins». *Faseb J.* vol. 4, no 8, p. 2460-2468.
- de Sousa, G., Langouet, S., Nicolas, F., Lorenzon, G., Placidi, M., Rahmani, R. et Guillouzo, A. 1996. «Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation». *Cell Biol Toxicol.* vol. 12, no 4-6, p. 351-358.
- Delauney, A. et Verma, D. 1993. «Proline biosynthesis and osmoregulation in plants.». *Plant J.* vol. 4, p. 215-223.
- Demel, R. A. et De Kruffyff, B. 1976. «The function of sterols in membranes». *Biochim Biophys Acta.* vol. 457, no 2, p. 109-132.
- Diener, B. et Oesch, F. 1995. «Cryopreserved and hypothermically stored rat liver parenchymal cells as metabolizing system in the Salmonella mutagenicity assay». *Mutat Res.* vol. 335, no 3, p. 309-316.



Diener, B., Utesch, D., Beer, N., Durk, H. et Oesch, F. 1993. «A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics». *Cryobiology*. vol. 30, no 2, p. 116-127.

Dou, M., de Sousa, G., Lacarelle, B., Placidi, M., Lechene de la Porte, P., Domingo, M., Lafont, H. et Rahmani, R. 1992. «Thawed human hepatocytes in primary culture». *Cryobiology*. vol. 29, no 4, p. 454-469.

Doucet, D., Tyshenko, M. G., Davies, P. L. et Walker, V. K. 2002. «A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana*». *Eur J Biochem*. vol. 269, no 1, p. 38-46.

Duman, J. G. et DeVries, A. L. 1972. «Freezing behavior of aqueous solutions of glycoproteins from the blood of an Antarctic fish». *Cryobiology*. vol. 9, no 5, p. 469-472.

Dunn, J. C., Tompkins, R. G. et Yarmush, M. L. 1992a. «Hepatocytes in collagen sandwich: Evidence for transcriptional and translational regulation». *J. Cell Biol.* vol. 116, p. 1043-1053.

Dunn, J. C., Tompkins, R. G. et Yarmush, M. L., . 1992b. «Hepatocytes in collagen sandwich: Evidence for transcriptional and translational regulation». *J. Cell Biol.* vol. 116, p. 1043-1053.

Dure, L., 3rd. 1993. «A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation». *Plant J.* vol. 3, no 3, p. 363-369.

Encyclopædia Britannica Inc. (2003) Encyclopædia Britannica. Inc

Fahy, G. M. 1986. «The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology». *Cryobiology*. vol. 23, no 1, p. 1-13.

Farrant, J. et Morris, G. J. 1973. «Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury». *Cryobiology*. vol. 10, no 2, p. 134-140.

Fowler, D., Limin, A. et Ritchie, J. 1999. «Low-temperature tolerance in cereals: models and genetic interpretation». *Crop Sc.* vol. 39, p. 626-633.

Franks, F., Mathias, S. F., Galfre, P., Webster, S. D. et Brown, D. 1983. «Ice nucleation and freezing in undercooled cells». *Cryobiology*. vol. 20, no 3, p. 298-309.

- Frenette Charron, J. B., Breton, G., Badawi, M. et Sarhan, F. 2002. «Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis». *FEBS Lett.* vol. 517, no 1-3, p. 129-132.
- Fujikawa, S. et Miura, K. 1986. «Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit-bodies of Basidiomycetes (*Lyophyllum ulmarium* (Fr.) Kühner)». *Cryobiology.* vol. 23, no 4, p. 371-382.
- Fujita, R., Hui, T., Chelly, M. et Demetriou, A. A. 2005. «The effect of antioxidants and a caspase inhibitor on cryopreserved rat hepatocytes». *Cell Transplant.* vol. 14, no 6, p. 391-396.
- Gaasbeek Janzen, J. W., Gebhardt, R., ten Voorde, G. H., Lamers, W. H., Charles, R. et Moorman, A. F. 1987. «Heterogeneous distribution of glutamine synthetase during rat liver development». *J Histochem Cytochem.* vol. 35, no 1, p. 49-54.
- Gallin, W. J., Prediger, E. A., Edelman, G. M. et Cunningham, B. A. 1985. «Isolation of a cDNA clone for the liver cell adhesion molecule (L-CAM)». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 82, no 9, p. 2809-2813.
- Gebhardt, R. 1988. «Different proliferative activity in vitro of periportal and perivenous hepatocytes». *Scand J Gastroenterol Suppl.* vol. 151, p. 8-18.
- Gerlach, J., Kloppel, K., Schauwecker, H. H., Tauber, R., Muller, C. et Bucherl, E. S. 1989. «Use of hepatocytes in adhesion and suspension cultures for liver support bioreactors». *Int J Artif Organs.* vol. 12, no 12, p. 788-792.
- Gerlach, J. C., Encke, J., Hole, O., Muller, C., Ryan, C. J. et Neuhaus, P. 1994. «Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion». *Transplantation.* vol. 58, no 9, p. 984-988.
- Giancotti, F. et Ruoslahti, E. 1999. «Integrin signalling.». *Science.* vol. 285, p. 1028-1032.
- Giancotti, F. G. 1997. «Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression.». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 9, p. 691-700.
- Glicklis, R., Shapiro, L., Agbaria, R., Merchuk, J. C. et Cohen, S. 2000. «Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds». *Biotechnol Bioeng.* vol. 67, no 3, p. 344-353.

- Gomez-Lechon, M. J., Donato, T., Ponsoda, X. et Castell, J. V. 2003. «Human hepatic cell cultures: in vitro and in vivo drug metabolism». *Altern Lab Anim.* vol. 31, no 3, p. 257-265.
- Gonzalez, F. J. 1992. «Human cytochromes P450: problems and prospects». *Trends Pharmacol Sci.* vol. 13, no 9, p. 346-352.
- Graether, S. P., Ye, Q., Davies, P. L. et Jia, Z. 1999. «Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of spruce budworm antifreeze protein». *J Struct Biol.* vol. 126, no 1, p. 72-75.
- Grant, M. H., Melvin, M. A., Shaw, P., Melvin, W. T. et Burke, M. D. 1985. «Studies on the maintenance of cytochromes P-450 and b5, monooxygenases and cytochrome reductases in primary cultures of rat hepatocytes». *FEBS Lett.* vol. 190, no 1, p. 99-103.
- Greaves, P., Williams, A. et Eve, M. 2004. «First dose of potential new medicines to humans: how animals help». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 3, no 3, p. 226-236.
- Green, T. 1990. «Chloroethylenes: a mechanistic approach to human risk evaluation». *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* vol. 30, p. 73-89.
- Grondin, M., Hamel, F., Averill-Bates, D. A. et Sarhan, F. 2008-a. «Wheat proteins enhance stability and function of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes ». *accepted in Cell Transplant.*
- Grondin, M., Hamel, F., Averill-Bates, D. A. et Sarhan, F. 2008-b. «Metabolic activity of cytochrome P450 isoforms in hepatocytes cryopreserved with wheat protein extract». *in Press, Drug Metab Dispos.*
- Grondin, M., Hamel, F., Averill-Bates, D. A. et Sarhan, F. 2008-c. «Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes». *submit at Biotechnol Bioeng.*
- Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D. et Guillouzo, A. 1983. «Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type». *Exp Cell Res.* vol. 143, no 1, p. 47-54.
- Guillemette, J., Marion, M., Denizeau, F., Fournier, M. et Brousseau, P. 1993. «Characterization of the in vitro hepatocyte model for toxicological evaluation:

repeated growth stimulation and glutathione response». *Biochem Cell Biol.* vol. 71, no 1-2, p. 7-13.

Guillouzo, A., Begue, J. M., Maurer, G. et Koch, P. 1988. «Identification of metabolic pathways of pindolol and fluperlapine in adult human hepatocyte cultures». *Xenobiotica.* vol. 18, no 2, p. 131-139.

Guillouzo, A., Rialland, L., Fautrel, A. et Guyomard, C. 1999. «Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation». *Chem Biol Interact.* vol. 121, no 1, p. 7-16.

Gumbiner, B. 1996. «Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.». *Cell Biol Toxicol.* vol. 84, p. 345-357.

Guy, C. 1990. «Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism.». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* vol. 41, p. 187-223.

Hamel, F., Grondin, M., Denizeau, F., Averill-Bates, D. A. et Sarhan, F. 2006. «Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes». *Biotechnol Bioeng.* vol. 95, no 4, p. 661-670.

Hare, P., Cress, W. et Van Staden, J. 1999. «Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction». *J. Exp. Bot.* vol. 50, p. 413-434.

Harwood, J. L., Jones, A. L., Perry, H., Rutter, A., Smith, K. L. et Williams, M. 1994 *Changes in plant lipids during temperature adaptation*, Cossins, A.R., ed. Ed., Portland Press Proceedings, London, UK.

Haussinger, D. 1990. «Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance». *Biochem J.* vol. 267, no 2, p. 281-290.

Hengstler, J. G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K. L., Bottger, T., Steinberg, P. et Oesch, F. 2000a. «Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction». *Chem Biol Interact.* vol. 125, no 1, p. 51-73.

Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T. et Oesch, F. 2000b. «Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction». *Drug Metab Rev.* vol. 32, no 1, p. 81-118.

Hewitt, N. J., Lecluyse, E. L. et Ferguson, S. S. 2007. «Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations». *Xenobiotica*. vol. 37, no 10, p. 1196-1224.

Hewitt, N. J. et Utesch, D. 2004. «Cryopreserved rat, dog and monkey hepatocytes: measurement of drug metabolizing enzymes in suspensions and cultures». *Hum Exp Toxicol*. vol. 23, no 6, p. 307-316.

Hey, J. M. et MacFarlane, D. R. 1998. «Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics». *Cryobiology*. vol. 37, no 2, p. 119-130.

Higashi, N., Kojima, N., Miura, M., Imai, K., Sato, M. et Senoo, H. 2004. «Cell-cell junctions between mammalian (human and rat) hepatic stellate cells». *Cell Tissue Res*. vol. 317, no 1, p. 35-43.

Holmberg, N. et Bülow, L. 1998. «Improving stress tolerance in plants by gene transfer». *Trends Plant Sci*. vol. 3, p. 61-66.

Honjoh, K. I., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Takata, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M. et Hatano, S. 2000. «Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27». *Biosci Biotechnol Biochem*. vol. 64, no 8, p. 1656-1663.

Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S. et Sarhan, F. 1995. «Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues». *Plant J*. vol. 8, no 4, p. 583-593.

Houle, R., Raoul, J., Levesque, J. F., Pang, K. S., Nicoll-Griffith, D. A. et Silva, J. M. 2003. «Retention of transporter activities in cryopreserved, isolated rat hepatocytes». *Drug Metab Dispos*. vol. 31, no 4, p. 447-451.

Houston, J. B. 1994. «Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance». *Biochem Pharmacol*. vol. 47, no 9, p. 1469-1479.

Hsu, S. C., Galceran, J. et Grosschedl, R. 1998. «Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with B-catenin.». *Mol Cell Biol*. vol. 18, p. 4807-4818.

- Hughes, M. A. et Dunn, M. A. 1996. «The molecular biology of plant acclimation to low temperature». *Journal of Experimental Botany*. vol. 47, p. 291-305.
- Huner, N., Öquist, G. et Sarhan, F. 1998. «Energy balance and acclimation to light and cold». *Trends Plant Sci.* vol. 3, p. 224-230.
- Hynes, R. 1992. «Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.». *Cell Biol Toxicol.* vol. 69, p. 11-25.
- Innes, G. K., Fuller, B. J. et Hobbs, K. E. 1988. «Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation». *Cryobiology*. vol. 25, no 1, p. 23-30.
- Jackson, B. A., Davies, J. E. et Chipman, J. K. 1985. «Cytochrome P-450 activity in hepatocytes following cryopreservation and monolayer culture». *Biochem Pharmacol.* vol. 34, no 18, p. 3389-3391.
- Jaenicke, R. 1991. «Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions». *Eur J Biochem.* vol. 202, no 3, p. 715-728.
- Jones, A. et Spring-Mills, E. 1983 *The Liver and Gallbladder*, Elsevier Ed., L. Weiss, New York
- Jungermann, K. 1986. «Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes». *Enzyme.* vol. 35, no 3, p. 161-180.
- Jungermann, K. et Katz, N. 1989. «Functional specialization of different hepatocyte populations». *Physiol Rev.* vol. 69, no 3, p. 708-764.
- Karlsson, J. O., Cravalho, E. G., Borel Rinkes, I. H., Tompkins, R. G., Yarmush, M. L. et Toner, M. 1993. «Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide». *Biophys J.* vol. 65, no 6, p. 2524-2536.
- Karlsson, J. O. et Toner, M. 1996. «Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues». *Biomaterials.* vol. 17, no 3, p. 243-256.
- Kedderis, G. L. 1997. «Extrapolation of in vitro enzyme induction data to humans in vivo». *Chem Biol Interact.* vol. 107, no 1-2, p. 109-121.
- Kim, B. H., Sung, S. R., Park, J. K., Kim, Y. I., Kim, K. J., Dong, S. H., Kim, H. J., Chang, Y. W., Lee, J. I. et Chang, R. 2001a. «Survival of conditionally

immortalized hepatocytes in the spleen of syngeneic rats». *J Gastroenterol Hepatol*. vol. 16, no 1, p. 52-60.

Kim, S. K., Yu, S. H., Lee, J. H., Lee, J. Y., Rademacher, A., Lee, D. H. et Park, J. K. 2001b. «Effect of collagen concentration on the viability and metabolic function of encapsulated hepatocytes». *Microbiol Biotechnol* vol. 11, p. 423-427.

Knight, C. A., DeVries, A. L. et Oolman, L. D. 1984. «Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice». *Nature*. vol. 308, no 5956, p. 295-296.

Knight, C. A. et Duman, J. G. 1986. «Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: A possible cryoprotective role.». *Cryobiology*. vol. 23, p. 256-262.

Knight, C. A., Hallett, J. et DeVries, A. L. 1988. «Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique». *Cryobiology*. vol. 25, no 1, p. 55-60.

Knudsen, K. A., Frankowski, C., Johnson, K. R. et Wheelock, M. J. 1998. «A role for cadherins in cellular signaling and differentiation». *J Cell Biochem Suppl*. vol. 30-31, p. 168-176.

Koide, N., Shinji, T., Tanabe, T., Asano, K., Kawaguchi, M., Sakaguchi, K., Koide, Y., Mori, M. et Tsuji, T. 1989. «Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 161, no 1, p. 385-391.

Kumar, A. et Minocha, S. 1998 *Transgenic manipulation of polyamine metabolism*, Amsterdam: Harwood

Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*. vol. 227, no 5259, p. 680-685.

Lazarou, J., Pomeranz, B. H. et Corey, P. N. 1998. «Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies». *Jama*. vol. 279, no 15, p. 1200-1205.

Lemire, J. M. et Fausto, N. 1991. «Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: cell type-specific expression and differential regulation». *Cancer Res*. vol. 51, no 17, p. 4656-4664.

- Li, A. P. 2007. «Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development». *Chem Biol Interact.* vol. 168, no 1, p. 16-29.
- Li, A. P., Gorycki, P. D., Hengstler, J. G., Kedderis, G. L., Koebe, H. G., Rahmani, R., de Sousas, G., Silva, J. M. et Skett, P. 1999. «Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel». *Chem Biol Interact.* vol. 121, no 1, p. 117-123.
- Lim, Y. S., Lee, H. C. et Lee, H. S. 2007. «Switch of cadherin expression from E- to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells». *Histochem Cell Biol.* vol. 127, no 2, p. 149-160.
- Lock, E. A., Mitchell, A. M. et Elcombe, C. R. 1989. «Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation». *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* vol. 29, p. 145-163.
- Loud, A. V. 1968. «A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells». *J Cell Biol.* vol. 37, no 1, p. 27-46.
- Lovelock, J. E. 1953a. «The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing». *Biochim Biophys Acta.* vol. 10, no 3, p. 414-426.
- Lovelock, J. E. 1953b. «The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing». *Biochim Biophys Acta.* vol. 11, no 1, p. 28-36.
- Lu, A. Y. et Coon, M. J. 1968. «Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes». *J Biol Chem.* vol. 243, no 6, p. 1331-1332.
- Lynch, D. V. et Steponkus, P. L. 1987. «Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma)». *Plant Physiol.* vol. 83, no 4, p. 761-767.
- Madan, A., DeHaan, R., Mudra, D., Carroll, K., LeCluyse, E. et Parkinson, A. 1999. «Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes». *Drug Metab Dispos.* vol. 27, no 3, p. 327-335.
- Marshall, C. B., Tomczak, M. M., Gauthier, S. Y., Kuiper, M. J., Lankin, C., Walker, V. K. et Davies, P. L. 2004. «Partitioning of fish and insect antifreeze



proteins into ice suggests they bind with comparable affinity». *Biochemistry*. vol. 43, no 1, p. 148-154.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. et Dejana, E. 1998. «Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration». *J Cell Biol.* vol. 142, no 1, p. 117-127.

Mazur, P. 1963. «Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing». *J Gen Physiol.* vol. 47, p. 347-369.

Mazur, P. 1965. «The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 125, no 2, p. 658-676.

Mazur, P. 1980. «Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities». *Orig Life.* vol. 10, no 2, p. 137-159.

Mazur, P. 1984. «Freezing of living cells: mechanisms and implications». *Am J Physiol.* vol. 247, no 3 Pt 1, p. C125-142.

Mazur, P., Leibo, S. P. et Chu, E. H. 1972. «A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells». *Exp Cell Res.* vol. 71, no 2, p. 345-355.

McNeil, S. D., Nuccio, M. L. et Hanson, A. D. 1999. «Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance». *Plant Physiol.* vol. 120, no 4, p. 945-950.

Meeks, R., Harrison, S. et Bull, R. 1991 *Hepatotoxicology*, CRC Press., FL

Meryman, H. T. 1966a. «The interpretation of freezing rates in biological materials». *Cryobiology.* vol. 2, no 4, p. 165-170.

Meryman, H. T. 1966b *Review of biological freezing*, Academic Press, New York,

Meryman, H. T. 1974. «Freezing injury and its prevention in living cells». *Annu Rev Biophys Bioeng.* vol. 3, no 0, p. 341-363.

- Mitchell, D. E. et Madore, M. A. 1992. «Patterns of assimilate production and translocation in muskmelon (*Cucumis melo* L.) : II. Low temperature effects». *Plant Physiol.* vol. 99, no 3, p. 966-971.
- Moffatt, P., Plaa, G. L. et Denizeau, F. 1996. «Rat hepatocytes with elevated metallothionein expression are resistant to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine cytotoxicity». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 136, no 1, p. 200-207.
- Moldeus, P., Hogberg, J. et Orrenius, S. 1978. «Isolation and use of liver cells». *Methods Enzymol.* vol. 52, p. 60-71.
- Monga, S. P., Pediaditakis, P., Mule, K., Stolz, D. B. et Michalopoulos, G. K. 2001. «Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration». *Hepatology.* vol. 33, p. 1098-1109.
- Mueller, S. O., Tuschl, G. et Kling, M. 2007. «Alternatives in pharmaceutical toxicology: global and focussed approaches--two case studies». *Altex.* vol. 24, no 2, p. 117-124.
- Murelli, C., Rizza, F., Marinone, A., Dulio, A., Terzi, V. et Cattivelli, L. 1995. «Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley». *Physiol Plant.* vol. 94, p. 87-93.
- Musat, A. I., Sattler, C. A., Sattler, G. L. et Pitot, H. C. 1993. «Reestablishment of cell polarity of rat hepatocytes in primary culture». *Hepatology.* vol. 18, p. 198-205.
- Muto, M. et Yamamoto, M. 1978 *The Liver: An Atlas of Scanning Electron Microscopy.*, Igaku-Shoin, Tokyo
- N'Dong, C., Danyluk, J., Wilson, K. E., Pocock, T., Huner, N. P. et Sarhan, F. 2002. «Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses». *Plant Physiol.* vol. 129, no 3, p. 1368-1381.
- Naidu, B., Paleg, L., Aspinall, D., Jennings, A. et Jones, G. 1991. «Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings». *Phytochem.* vol. 30, p. 407-409.
- Nardid, O., Dyubko, T. et Repina, S. 1997. «A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins». *Cryobiology.* vol. 34, no 2, p. 107-113.

- Nathke, I. S., Hinck, L., Swedlow, J. R., Papkoff, J. et Nelson, W. J. 1994. «Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells». *J Cell Biol.* vol. 125, no 6, p. 1341-1352.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. et Nebert, D. W. 1996. «P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature». *Pharmacogenetics.* vol. 6, no 1, p. 1-42.
- Ng, N. F. et Hew, C. L. 1992. «Structure of an antifreeze polypeptide from the sea raven. Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins». *J Biol Chem.* vol. 267, no 23, p. 16069-16075.
- Nicoll-Griffith, D. A., Chauret, N., Houle, R., Day, S. H., D'Antoni, M. et Silva, J. M. 2004. «Use of a benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor as a selective fluorescent probe for CYP3A activity in primary cultured rat and human hepatocytes». *Drug Metab Dispos.* vol. 32, no 12, p. 1509-1515.
- Nishida, I. et Murata, N. 1996. «Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* vol. 47, p. 541-568.
- Noctor, G. et Foyer, C. H. 1998. «Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* vol. 49, p. 249-279.
- Nomura, M., Muramoto, Y., Yasuda, S., Takabe, T. et Kishitani, S. 1995. «The accumulation of glycine betaine during cold acclimation in early and late cultivars of barley.». *Euphytica.* vol. 83, p. 247-250.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D. et Hanson, A. D. 1999. «Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance». *Curr Opin Plant Biol.* vol. 2, no 2, p. 128-134.
- O'Brien, P. J. et Siraki, A. G. 2005. «Accelerated cytotoxicity mechanism screening using drug metabolising enzyme modulators». *Curr Drug Metab.* vol. 6, no 2, p. 101-109.
- O'Grady, J., Lake, J. et Howdle, P. 2001 *Comprehensive clinical hepatology*, Mosby, St. Louis

Olfert, E. D., Cross, B. M. et McWilliam, A. A. (eds). (1993) *Guide to the care and use of experimental animals*, 2e Ed., Canadian Council on Animal Care, Ottawa

Padgham, C. R. et Paine, A. J. 1993. «Altered expression of cytochrome P-450 mRNAs, and potentially of other transcripts encoding key hepatic functions, are triggered during the isolation of rat hepatocytes». *Biochem J.* vol. 289 ( Pt 3), p. 621-624.

Paine, A. J. 1990. «The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system». *Chem Biol Interact.* vol. 74, no 1-2, p. 1-31.

Paine, A. J. 1991. «The cytochrome P450 gene superfamily». *Int J Exp Pathol.* vol. 72, no 3, p. 349-363.

Paine, A. J. 1995. «Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance». *Hum Exp Toxicol.* vol. 14, no 1, p. 1-7.

Paine, A. J. 1996. «Validity and reliability of in vitro systems in safety evaluation». *Environmental Toxicology and Pharmacology.* vol. 2, p. 207-212.

Paine, A. J. et Legg, R. F. 1978. «Apparent lack of correlation between the loss of cytochrome P-450 in hepatic parenchymal cell culture and the stimulation of haem oxygenase activity». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 81, no 2, p. 672-679.

Paine, A. J. et Villa, P. 1980. «Ligands maintain cytochrome P-450 in liver cell culture by affecting its synthesis and degradation». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 97, no 2, p. 744-750.

Palasz, A. T. et Mapletoft, R. J. 1996. «Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances». *Biotechnol Adv.* vol. 14, no 2, p. 127-149.

Pegg, D. E. et Diaper, M. P. 1988. «On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes». *Biophys J.* vol. 54, no 3, p. 471-488.

Peifer, M. et Polakis, P. 2000. «Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus». *Science.* vol. 287, p. 1606–1609.

- Perras, M. et Sarhan, F. 1984. «Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides.». *Physiologia Plantarum*. vol. 60, p. 129-132.
- Petropoulos, C. J., Yaswen, P., Panzica, M. et Fausto, N. 1985. «Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of alpha-fetoprotein RNA sequences in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers». *Cancer Res.* vol. 45, no 11 Pt 2, p. 5762-5768.
- Pinkse, G. G., Voorhoeve, M. P., Noteborn, M., Terpstra, O. T., Bruijn, J. A. et De Heer, E. 2004. «Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix». *Liver Int.* vol. 24, no 3, p. 218-226.
- Poliard, A. M., Bernuau, D., Tournier, I., Legres, L. G., Schoevaert, D., Feldmann, G. et Sala-Trepat, J. M. 1986. «Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period». *J Cell Biol.* vol. 103, no 3, p. 777-786.
- Pollock, C., Eagles, C. et Sims, I. 1988. «Effect of photoperiod and irradiance changes upon development of freezing tolerance and accumulation of soluble carbohydrate in seedlings of *Lolium perenne* grown at 2°C.». *Ann Bot.* vol. 62, p. 95-100.
- Powis, G., Santone, K. S., Melder, D. C., Thomas, L., Moore, D. J. et Wilke, T. J. 1987. «Cryopreservation of rat and dog hepatocytes for studies of xenobiotic metabolism and activation». *Drug Metab Dispos.* vol. 15, no 6, p. 826-832.
- Rana, B., Mischoulon, D., Xie, Y., Bucher, N. L. et Farmer, S. R. 1994. «Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediateearly growth response transcription factors». *Mol Cell Biol.* vol. 14, p. 5858-5869.
- Rao, R. K., Basuroy, S., Rao, V. U., Karnaky Jr, K. J. et Gupta, A. 2002. «Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress». *Biochem J.* vol. 368, no Pt 2, p. 471-481.

- Rasmussen, D. H., Macaulay, M. N. et MacKenzie, A. P. 1975. «Supercooling and nucleation of ice in single cells». *Cryobiology*. vol. 12, no 4, p. 328-339.
- Raymond, J. A. et DeVries, A. L. 1977. «Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 74, no 6, p. 2589-2593.
- Reader, S., Marion, M. et Denizeau, F. 1993. «Flow cytometric analysis of the effects of tri-n-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes». *Toxicology*. vol. 80, no 2-3, p. 117-129.
- Reinach, B., de Sousa, G., Dostert, P., Ings, R., Gugenheim, J. et Rahmani, R. 1999. «Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes». *Chem Biol Interact*. vol. 121, no 1, p. 37-48.
- Rendic, S. et Di Carlo, F. J. 1997. «Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors». *Drug Metab Rev*. vol. 29, no 1-2, p. 413-580.
- Rialland, L., Guyomard, C., Scotte, M., Chesne, C. et Guillouzo, A. 2000. «Viability and drug metabolism capacity of alginate-entrapped hepatocytes after cryopreservation». *Cell Biol Toxicol*. vol. 16, no 2, p. 105-116.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig, F., Epplen, J., Mayer, S., Muller, C. et Kemler, R. 1987. «The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of  $Ca^{2+}$ -dependent cell adhesion». *Embo J*. vol. 6, no 12, p. 3647-3653.
- Rubinsky, B., Arav, A. et Fletcher, G. L. 1991. «Hypothermic protection--a fundamental property of "antifreeze" proteins». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 180, no 2, p. 566-571.
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L. et Kirschner, M. W. 2000. «Control of B-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the Wnt pathway in Xenopus egg extracts.». *Mol. Cell*,=. vol. 5, p. 523-532.
- Sandker, G. W., Slooff, M. J. et Groothuis, G. M. 1992. «Drug transport, viability and morphology of isolated rat hepatocytes preserved for 24 hours in University of Wisconsin solution». *Biochem Pharmacol*. vol. 43, no 7, p. 1479-1485.

- Santone, K. S., Melder, D. C. et Powis, G. 1989. «Studies of chemical toxicity to fresh and cryopreserved rat hepatocytes». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 97, no 2, p. 370-376.
- Schneider, U. et Mazur, P. 1987. «Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos». *Cryobiology.* vol. 24, no 1, p. 17-41.
- Seglen, P. O. 1976. «Preparation of isolated rat liver cells». *Methods Cell Biol.* vol. 13, p. 29-83.
- Shaddock, J. G., Snawder, J. E. et Casciano, D. A. 1993. «Cryopreservation and long-term storage of primary rat hepatocytes: effects on substrate-specific cytochrome P450-dependent activities and unscheduled DNA synthesis». *Cell Biol Toxicol.* vol. 9, no 4, p. 345-357.
- Shen, B., Jensen, R. G. et Bohnert, H. J. 1997. «Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts». *Plant Physiol.* vol. 113, no 4, p. 1177-1183.
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H. J. et Jensen, R. G. 1997. «Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L.». *Plant Physiol.* vol. 115, no 3, p. 1211-1219.
- Sheveleva, E. V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R. G. et Bohnert, H. J. 1998. «Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions». *Plant Physiol.* vol. 117, no 3, p. 831-839.
- Shimizu, Y. 1996. «Intracellular signaling pathways and the regulation of cell adhesion». *Hum Cell.* vol. 9, no 3, p. 175-180.
- Sidebottom, C., Buckley, S., Pudney, P., Twigg, S., Jarman, C., Holt, C., Telford, J., McArthur, A., Worrall, D., Hubbard, R. et Lillford, P. 2000. «Heat-stable antifreeze protein from grass». *Nature.* vol. 406, no 6793, p. 256.
- Silva, J. M., Day, S. H. et Nicoll-Griffith, D. A. 1999. «Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes». *Chem Biol Interact.* vol. 121, no 1, p. 49-63.
- Siminovitch, D. et Cloutier, Y. 1982. «Twenty-four-hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation

stress at room temperature in the dark». *Plant Physiol.* vol. 69, no 1, p. 250-255.

Sistare, F. D. et DeGeorge, J. J. 2007. «Preclinical predictors of clinical safety: opportunities for improvement». *Clin Pharmacol Ther.* vol. 82, no 2, p. 210-214.

Sivaraman, A., Leach, J. K., Townsend, S., Iida, T., Hogan, B. J., Stolz, D. B., Fry, R., Samson, L. D., Tannenbaum, S. R. et Griffith, L. G. 2005. «A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction». *Curr Drug Metab.* vol. 6, no 6, p. 569-591.

Smallwood, M., Worrall, D., Byass, L., Elias, L., Ashford, D., Doucet, C. J., Holt, C., Telford, J., Lillford, P. et Bowles, D. J. 1999. «Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*)». *Biochem J.* vol. 340 ( Pt 2), p. 385-391.

Smart, C. C. et Flores, S. 1997. «Overexpression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase leads to elevated levels of inositol in *Arabidopsis*». *Plant Mol Biol.* vol. 33, no 5, p. 811-820.

Smith, G., Stubbins, M. J., Harries, L. W. et Wolf, C. R. 1998. «Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily». *Xenobiotica.* vol. 28, no 12, p. 1129-1165.

Son, J. H., Kim, K. H., Nam, Y. K., Park, J. K. et Kim, S. K. 2004. «Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte». *Biotechnol Lett.* vol. 26, no 10, p. 829-833.

Sosef, M. N., Baust, J. M., Sugimachi, K., Fowler, A., Tompkins, R. G. et Toner, M. 2005. «Cryopreservation of isolated primary rat hepatocytes: enhanced survival and long-term hepatospecific function». *Ann Surg.* vol. 241, no 1, p. 125-133.

Steinberg, P., Klingelhoffer, A., Schafer, A., Wust, G., Weisse, G., Oesch, F. et Eigenbrodt, E. 1999. «Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats». *Virchows Arch.* vol. 434, no 3, p. 213-220.

Steponkus, P. L. a. W., S.C. 1978 *Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing*, Academic Press, New York



- Stevenson, D. J., Morgan, C., McLellan, L. I. et Helen Grant, M. 2007. «Reduced glutathione levels and expression of the enzymes of glutathione synthesis in cryopreserved hepatocyte monolayer cultures». *Toxicol In Vitro*. vol. 21, no 3, p. 527-532.
- Stoop, J., Williamson et JD, P., DM. 1996. «Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress.». *Trends Plant Sci*. vol. 1, p. 139–144.
- Stroh, C., Cassens, U., Samraj, A. K., Sibrowski, W., Schulze-Osthoff, K. et Los, M. 2002. «The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells». *Faseb J*. vol. 16, no 12, p. 1651-1653.
- Swales, N. J., Johnson, T. et Caldwell, J. 1996-b. «Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. II. Assessment of metabolic capacity using testosterone metabolism». *Drug Metab Dispos*. vol. 24, no 11, p. 1224-1230.
- Swales, N. J., Luong, C. et Caldwell, J. 1996. «Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. I. Comparative viability studies». *Drug Metab Dispos*. vol. 24, no 11, p. 1218-1223.
- Takahashi, M., Matsue, H., Matsushita, M., Nakajima, Y. et Uchino, J. 1993. «Isolation and culture of human hepatocytes from resected liver tissue as a bioreactor for a hybrid artificial liver». *Artif Organs*. vol. 17, no 7, p. 653-659.
- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T. et Matsumoto, J. J. 1985. «Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives». *Cryobiology*. vol. 22, no 5, p. 446-456.
- Tao, R., Uratsu, S. L. et Dandekar, A. M. 1995. «Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase». *Plant Cell Physiol*. vol. 36, no 3, p. 525-532.
- Tarczynski, M., Jensen, R. et Bohnert, H. 1993. «Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol.». *Science*. vol. 259, p. 508–510.
- Tarczynski, M. C., Jensen, R. G. et Bohnert, H. J. 1992. «Expression of a bacterial mtlD gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 89, no 7, p. 2600-2604.

- Terry, C., Bailey, M., Mitry, R. R., Lehec, S. C., Dhawan, A. et Hughes, R. D. 2006a. «Analysis of the effects of cryopreservation on rat hepatocytes using SELDI-TOF mass spectrometry». *Cell Transplant.* vol. 15, no 1, p. 35-43.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. R. et Hughes, R. D. 2006b. «Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art». *Cryobiology.* vol. 53, no 2, p. 149-159.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. R., Lehec, S. C. et Hughes, R. D. 2006c. «Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing». *Liver Transpl.* vol. 12, no 1, p. 165-177.
- Thomashow, M. F. 1990. «Molecular genetics of cold acclimation in higher plants». *Advances in Genetics.* vol. 28, p. 99-131.
- Thurman, R. G. et Kauffman, F. C. 1985. «Sublobular compartmentation of pharmacologic events (SCOPE): metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule». *Hepatology.* vol. 5, no 1, p. 144-151.
- Tobe, S., Takei, Y., Kobayashi, K. et Akaike, T. 1992. «Tissue reconstruction in primary cultured rat hepatocytes on asialoglycoprotein model polymer». *Artif Organs.* vol. 16, no 5, p. 526-532.
- Tomczak, M. M., Hinch, D. K., Estrada, S. D., Feeney, R. E. et Crowe, J. H. 2001. «Antifreeze proteins differentially affect model membranes during freezing». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1511, no 2, p. 255-263.
- Tong, J. Z., De Lagausie, P., Furlan, V., Cresteil, T., Bernard, O. et Alvarez, F. 1992. «Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids». *Exp Cell Res.* vol. 200, no 2, p. 326-332.
- Traber, P. G., Chianale, J. et Gumucio, J. J. 1988. «Physiologic significance and regulation of hepatocellular heterogeneity». *Gastroenterology.* vol. 95, no 4, p. 1130-1143.
- Tramontano, W. et Jouve, D. 1997. «Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents.». *Phytochem.* vol. 44, p. 1037-1040.
- Tremblay, K., Ouellet, F., Fournier, J., Danyluk, J. et Sarhan, F. 2005. «Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice

recrystallization inhibition proteins from cereals». *Plant Cell Physiol.* vol. 46, no 6, p. 884-891.

Trunova, T. I. (1982) Mechanism of winter wheat hardening at low temperature. In: Li, P. H. e. S., A., eds (ed). *Plant cold hardiness and fkezing stress: Mechanisms and Crop Implications*, Academic Press, New-York, USA

Tsukita, S. et Furuse, M. 1999. «Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?». *Trends Cell Biol.* vol. 9, no 7, p. 268-273.

Tsukita, S., Nagafuchi, A. et Yonemura, S. 1992. «Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 4, no 5, p. 834-839.

Uchino, J., Matsue, H., Takahashi, M., Nakajima, Y., Matsushita, M., Hamada, T. et Hashimura, E. 1991. «A hybrid artificial liver system. Function of cultured monolayer pig hepatocytes in plasma from hepatic failure patients». *ASAIO Trans.* vol. 37, no 3, p. M337-338.

Uemura, M. et Steponkus, P. L. 1994. «A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance». *Plant Physiol.* vol. 104, no 2, p. 479-496.

Utrecht, J. 2006. «Evaluation of which reactive metabolite, if any, is responsible for a specific idiosyncratic reaction». *Drug Metab Rev.* vol. 38, no 4, p. 745-753.

Uotila, M., Ruoslahti, E. et Engvall, E. 1981. «Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein». *J Immunol Methods.* vol. 42, no 1, p. 11-15.

Utesch, D., Arand, M., Thomas, H., Petzinger, E. et Oesch, F. 1992. «Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in hybrid cell lines established by fusion of primary rat liver parenchymal cells with hepatoma cells». *Xenobiotica.* vol. 22, no 12, p. 1451-1457.

Varapetian, B. et Jackson, M. 1997. «Plant adaptations to anaerobic stress». *Ann Bot.* vol. 79, p. 3-20.

Vernon, D., Tarczynski, M., Jensen, R. et Bohnert, H. 1993. «Cyclitol production in transgenic tobacco». *Plant J.* vol. 4, p. 199-205.

- Vleminckx, K. et Kemler, R. 1999. «Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling». *Bioessays*. vol. 21, no 3, p. 211-220.
- Wan, X., Lachapelle, M., Marion, M., Fournier, M. et DenizEAU, F. 1993. «Recovery potential of hepatocytes from inhibition of albumin secretion by cadmium». *J Toxicol Environ Health*. vol. 38, no 4, p. 381-392.
- Wang, J. H. 2000. «A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation». *Cryobiology*. vol. 41, no 1, p. 1-9.
- Wanner, L. A. et Junttila, O. 1999. «Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis». *Plant Physiol*. vol. 120, no 2, p. 391-400.
- Wilson, J. W. et Leduc, E. 1948. «The occurrence and formation of binucleate cells and polypoid nuclei in the mouse». *Am. J. Anat.* vol. 82, p. 353-391.
- Wojcik, E., Dvorak, C., Chianale, J., Traber, P. G., Keren, D. et Gumucio, J. J. 1988. «Demonstration by in situ hybridization of the zonal modulation of rat liver cytochrome P-450b and P-450e gene expression after phenobarbital». *J Clin Invest*. vol. 82, no 2, p. 658-666.
- Wright, M. C. et Paine, A. J. 1992. «Evidence that the loss of rat liver cytochrome P450 in vitro is not solely associated with the use of collagenase, the loss of cell-cell contacts and/or the absence of an extracellular matrix». *Biochem Pharmacol*. vol. 43, no 2, p. 237-243.
- Wrighton, S. A., Ring, B. J. et VandenBranden, M. 1995. «The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies». *Toxicol Pathol*. vol. 23, no 2, p. 199-208.
- Wu, Q. et Maniatis, T. 1999. «A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes». *Cell*. vol. 97, no 6, p. 779-790.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. et Somero, G. N. 1982. «Living with water stress: evolution of osmolyte systems». *Science*. vol. 217, no 4566, p. 1214-1222.
- Yang, D. S., Sax, M., Chakrabarty, A. et Hew, C. L. 1988. «Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications». *Nature*. vol. 333, no 6170, p. 232-237.

Zaleski, J. et Bryla, J. 1978. «Effect of alloxan-diabetes on gluconeogenesis and ureogenesis in isolated rabbit liver cells». *Biochem J.* vol. 176, no 2, p. 563-568.

Zaleski, J., Richburg, J. et Kauffman, F. C. 1993. «Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen». *Biochem Pharmacol.* vol. 46, no 1, p. 111-116.

Zhou, B. L., Arakawa, K., Fujikawa, S. et Yoshida, S. 1994. «Cold-induced alterations in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat.». *Plant Cell Physiology.* vol. 35, p. 175-182.

Zhurinsky, J., Shtutman, M. et Ben-Ze'ev, A. 2000a. «Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles». *J Cell Sci.* vol. 113 ( Pt 18), p. 3127-3139.

Zhurinsky, J., Shtutman, M. et Ben-Ze'ev, A. 2000b. «Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin.». *Mol Cell Biol.* vol. 20, p. 4238-4252.

Zvibel, I., Smets, F. et Soriano, H. 2002. «Anoikis: roadblock to cell transplantation?». *Cell Transplant.* vol. 11, no 7, p. 621-630.